UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER KOHLENSTOFF-KATABOLIT-INAKTIVIERUNG IN HEFEN: ENTWICKLUNG EINES SCREENING-SYSTEMS ZUR ISOLIERUNG VON INAKTIVIERUNGS-MUTANTEN UND DEREN CHARAKTERISIERUNG

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Leonore Klaus

aus Frankfurt am Main

1985

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546522_0017

UNTERSUCHUNGEN ZUM MECHANISMUS DER KOHLENSTOFF-KATABOLIT-INAKTIVIERUNG IN HEFEN: ENTWICKLUNG EINES SCREENING-SYSTEMS ZUR ISOLIERUNG VON INAKTIVIERUNGS-MUTANTEN UND DEREN CHARAKTERISIERUNG

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard-Karls-Universität zu Tübingen

vorgelegt von

Leonore Klaus

aus Frankfurt am Main

1985

Tag der mündlichen Prüfung:	30.7.1985
Dekan:	Prof. Dr. K.-A. Kovar
1. Berichterstatter:	Prof. Dr. D. Mecke
2. Berichterstatter:	Prof. Dr. K. Eisele

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Anleitung von Herrn Prof. Dr. D. Mecke in der Zeit von Oktober 1981 - Mai 1985 am Physiologisch - chemischen Institut der Universität Tübingen durchgeführt.

Bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. D. Mecke möchte ich mich ganz herzlich für die gute Betreuung und die ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Mein Dank gilt auch Herrn E. Eichele, Leiter der Institutswerkstatt, der durch die Konstruktion der Apparaturen eine wichtige Vorraussetzung für meine Arbeit schuf, und Herrn G. Dussling, der mich bei der Durchführung des Screenings unterstützte.

Herrn Dr. K.-D. Entian danke ich für die Betreuung.

Bei meinen Laborkollegen, darunter ganz besonders bei Kai Fröhlich, Bernd Meurer und Rudi Vogel, möchte ich mich für die sehr gute Zusammenarbeit und die gemeinsamen Anstrengungen bei der Lösung von Problemen bedanken.

Dem Verband der chemischen Industrie, Stiftung Stipendien-Fonds, sei für die Verleihung eines Promotionsstipendiums herzlich gedankt.

für meine Eltern
und für Marcel

Inhaltsverzeichnis Seite

1.	Einleitung	1
1. 1.	Glucose-Repression	2
1. 2.	Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung	5
1 3.	Aufgabenstellung	13
2.	Material und Methoden	14
2. 1.	Verwendete Stämme	14
2. 2.	Chemikalien	14
2. 3.	Kulturmedien	15
2. 4.	Puffer	15
2. 5.	Anzucht der Hefen, Einzelzellausstrich	16
2. 6.	Derepressions-, Inaktivierungs- und Reaktivierungs-Bedingungen	16
2. 7.	Gewinnung der Rohextrakte	18
2. 7. 1.	Rohextrakte zur Enzymbestimmung	18
2. 7. 2.	Rohextrakte zur Metabolitbestimmung	18
2. 7. 3.	Rohextrakte zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes	18
2. 8.	Protein-, Enzym- und Metabolitbestimmung	19
2. 8. 1.	Proteinbestimmung	19
2. 8. 2.	Aktivitätsbestimmung der Enzyme	19
2. 8. 3.	Metabolitbestimmung	21
2. 9.	Genetische Methoden	23
2. 9. 1.	Mutangenisierung	23
2. 9. 2.	Kreuzung	23
2. 9. 3.	Sphäroplastenfusion	23
2. 9. 4.	Elektrofusion	24
2. 9. 5.	Sporulation und Tetradenanalyse	24
2.10.	Elektrophoretische Methoden	25
2.11.	DNA-Isolierung und DNA-Hybridisierung nach Southern	25
2.11. 1.	DNA-Isolierung	25
2.11. 2.	Restriktionsverdau und Southern-Blot	26
2.11. 3.	Markierung von DNA	27
2.11. 4.	Hybridisierung von Nitrocellulose-Filtern mit markierter DNA nach Southern	29

3.	Ergebnisse	30
3. 1.	Suche eines Selektionssystems für Mutanten mit ausgefallener Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung	30
3. 2.	Ausarbeitung eines Screening-Systems	33
3. 2. 1.	Vorversuche	34
3. 2. 2.	Screening-System	41
3. 2. 3.	Kontrolle des Screening-Systems	44
3. 3.	Durchführung des Screeningsystems zur Isolierung von Mutanten mit ausgefallener Inaktivierung von S. cerev.	45
3. 4.	Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung bei verschiedenen Hefen	49
3. 5.	Identifizierung der Hefe LD und vergleichende Hybridisierung von verschiedenen Hefen	59
3. 5. 1.	biochemische Untersuchungen der Hefe LD	59
3. 5. 2.	vergleichende Hybridisierung von Gesamt-DNA aus verschiedenen Hefen mit einem Gen aus S. cerevisiae	59
3. 6.	Screening zur Isolierung von Mutanten mit ausgefallener Kohlenstoff-Katabolt-Inaktivierung von C. parapsilosis	63
3. 7.	Biochemische Untersuchungen der Mutanten LDcci1 und LDcci2	66
3. 7. 1.	Wachstum auf verschiedenen C-Quellen, MDH- und FBPase- Aktivität in unterschiedlichen Wachstumsphasen	66
3. 7. 2.	Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glykolyse-Enzyme	68
3. 7. 3.	Bestimmung der Glykolyse-Metabolite	74
3. 7. 4.	Bestimmung des ATP- und ADP-Gehaltes, sowie des cAMP-Spiegels	77
3. 7. 5.	Fusion von LDcci1 und LDcci2 mit S. cerevisiae	79
4.	Diskussion	81
5.	Zusammenfassung	91
6.	Literatur	93

Abkürzungen:

Abb.	Abbildung
Bp	DNA-Basenpaare
cAMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
EMS	Ethylmethansulfonsäure
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
kBp	kilo DNA-Basenpaare (1000Bp)
KPP	Kaliumphosphatpuffer (0,1M, pH 6,5)
MDH	Malat Dehydrogenase
MTT	3(4,5-Dimethyl-thiazolyl-2)-2,5-diphenyl - Tetrazoliumbromid
OD	Optische Dichte
PEG	Polyethylenglycol
PEP-CK	Phosphoenolpyruvat Carboxykinase
SDS	Natriumdodecylsulfat
Tab.	Tabelle
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute
YEP	1% Hefeextrakt, 2% Bactopepton

1. Einleitung

Alle Organismen, die unter verschiedenen Wachstumsbedingungen leben können, müssen ihre Stoffwechselwege der entsprechenden Lage möglichst optimal anpassen. Dies geschieht in der Regel dadurch, daß die Geschwindigkeit enzymkatalysierter Reaktionen durch Veränderung der Enzymmenge oder der Enzymaktivität variiert wird.

Die Hefe Saccharomyces cerevisiae hat als fakultativer Anaerobier, der sowohl auf vergärbaren Zuckern, als auch nicht vergärbaren C-Quellen wie Ethanol, Acetat und Glycerin wachsen kann, mehrere Möglichkeiten die grundlegenden Stoffwechselwege wie Glykolyse, Glucogenese, Glyoxylatzyklus, Citratzyklus und Atmungskette gezielt zu koordinieren. Auf der Ebene der Transkription kann durch Induktion oder Repression der Enzymsynthese die Enzymmenge gesteuert werden. Das bewirkt eine langfristige Umstellung auf veränderte Konzentrationen an verfügbaren Nährsubstraten. Als eine posttranslationale Kontrolle kann die verstärkte Proteolyse von Enzymen angesehen werden, die über die Lebensdauer der Enzyme den Enzymspiegel senkt und somit deren Aktivität verringert. Beide Mechanismen können einzelne Enzyme betreffen, oder übergeordnet mehrere Stoffwechselwege beeinflussen. Beispiele für eine koordinierte Regulation komplexer Stoffwechselwege sind die Kohlenstoff-Katabolit-Repression, die Stickstoff-Katabolit-Repression und die Phosphat-Repression, sowie die Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung.

Schließlich kann die Aktivität kurzfristig durch allosterische Modifikation der Enzyme mit Aktivatoren bzw. Inhibitoren, über Feedbackkontrolle und durch Veränderung der V_{max} spezifisch beeinflußt werden. Das Zusammenwirken aller Regulationsmöglichkeiten dient der optimalen Anpassung der Zelle an veränderte Milieubedingungen.

1.1. Glucose-Repression

Die Glucose-Repression stellt einen mehrere Stoffwechselwege betreffenden, übergeordneten Regulationsmechanismus dar. Epps und Gale (1942) beobachteten dieses Phänomen erstmals in Escherichia coli bei Enzymen, die Aminosäuren metabolisieren. Neidhardt und Magasanik wiesen 1956 nach, daß besonders am Katabolismus anderer Kohlenhydrate beteiligte Enzyme durch Glucose reprimiert wurden. Magasanik (1961) vermutete einen Katabolit-Anstau aufgrund der schnellen Glucose-Aufnahme als molekulare Ursache der Repression und nannte dieses Verhalten Katabolit-Repression.

Inzwischen wurde für Escherichia coli anhand des lac-Operons ein anderer Mechanismus aufgeklärt. Bei Glucose-Mangel ist der cAMP-Spiegel stark erhöht, wodurch die Bindung eines sogenannten CAP-Proteins an die DNA ermöglicht wird. Dies erleichtert der RNA-Polymerase die Anheftung in der Promotorregion und bewirkt so bei Anwesenheit des Induktors Allolaktose eine Transkription der nachfolgenden Strukturgene. Der Induktor gibt durch Ablösung des Repressors das Operatorgen zur Transkription frei. Glucose senkt den cAMP-Spiegel bei Escherichia coli und führt so zur Verringerung der Transkriptionsrate.

Bei der Hefe Saccharomyces cerevisiae werden folgende Stoffwechselwege bzw. Enzyme von der Glucose-Repression erfaßt: Galactozymase (Spiegelman und Reiner, 1947), Atmungsenzyme (Swanson und Clifton, 1948; Polakis et al., 1965), die glucogenetischen Enzyme (Gancedo et al., 1965; Witt et al., 1966b; Gancedo und Schwerzmann, 1976), die Enzyme des Glyoxylatzyklus und des Citratzyklus (Polakis und Bartley, 1965), die alpha-Glucosidase (van Wijk et al., 1969) und die Invertase (Gascón et al., 1968). Die Repression kann auch durch andere Hexosen, wie Fructose und Mannose ausgelöst werden. Im Bereich der Glucose-Verwertung ist die Repression von einer Induktion der Glykolyseenzyme Enolase II, Pyruvatkinase und Pyruvat-Decarboxylase (Entian et al., 1984; Schmitt und Zimmermann, 1982) begleitet.

Entsprechend der Wirkung bei Escherichia coli wurde die Rolle des cAMP´s auch bei Hefen untersucht. Schlanderer und Dellweg (1974) stellten einen umgekehrt proportionalen Zusammenhang von Glucosekonzentration im Medium und cAMP-Spiegel fest. Im Gegensatz dazu fanden Eraso und Gancedo (1984) einen zwei bis dreifach höheren cAMP-Spiegel unter Repressionsbedingungen gegenüber Derepressionsbedingungen. Eine Repressionsauslösung durch niedrige cAMP-Spiegel (analog zu Escherichia coli) ist daher unwahrscheinlich. Mit Hilfe einer Adenylatcyklase-Mutante konnte schließlich gezeigt werden, daß die cAMP-Konzentration keinen Einfluß auf die Glucose-Repression hat (Matsumoto et al., 1982a und b).

Weitere Informationen zum Mechanismus der Glucose-Repression konnten durch die Isolierung von Repressions-Mutanten gewonnen werden. Hierfür entwickelten Zimmermann und Scheel (1977) ein Selektionssystem, das die Repression des Indikatorenzyms Invertase als Selektionsprinzip ausnutzt. Drei Typen von Mutanten konnten isoliert werden, die hex1, hex2 und cat80 genannt wurden. Keine dieser Mutanten zeigte einen Katabolitanstau, wie er von Magasanik gefordert wurde. Sie unterschieden sich aber in ihrer Hexokinase-Aktivität (Entian et al., 1977; Entian und Zimmermann, 1980).

Die cat80-Mutante hatte eine normale Hexokinase-Aktivität. Elektrophoretische Auftrennung eines Rohextraktes der hex1-Mutante mit anschließender Aktivitätsanfärbung ergab für die Glucokinase und die Hexokinase PI die normale Enzymmenge, während das Hexokinase-Isoenzym PII völlig fehlte. Die hex1-Mutante wurde mit einem Wildtyp gepaart, sporuliert und anschließend durch Tetradenanalyse untersucht. Dabei war das Fehlen der Hexokinase PII immer mit einem Defekt der Kohlenstoff-Katabolit-Repression gekoppelt. Durch Allelietests und Nachweis eines defekten Genproduktes zeigte sich, daß bei der hex1-Mutante ein Strukturgen des Hexokinase-Isoenzyms PII getroffen war (Entian, 1980; Entian und Mecke, 1982). Die hex2-Mutation verursachte durch einen

Regulationsdefekt eine erhöhte Hexokinase PII Synthese (Entian, 1981). Die Regulation der Hexokinase PII-Synthese wird also durch das HEX2 Gen kontrolliert. Beide Mutanten weisen auf einen Zusammenhang zwischen Hexokinase PII und der Glucose-Repression hin.

Außer ihrer katalytischen Funktion besitzt die Hexokinase PII offenbar als bifunktionelles Enzym noch eine regulatorische Aktivität. Ausgehend von einem diploiden Stamm, der nur noch ein Gen für eine funktionsfähige Hexokinase PII besaß, wurde die hex1^{r}-Mutante isoliert. Bei ausgefallener Glucose-Repression ist sie trotzdem noch katalytisch aktiv (Entian und Fröhlich, 1984). Das aus dieser Mutante isolierte Hexokinase-Isoenzym entspricht in seinen enzymkinetischen Eigenschaften der Hexokinase PII des Wildtyps. Offensichtlich ist eine vom katalytischen Zentrum unabhängige "recognition site" an der Hexokinase PII für die Glucose-Repression verantwortlich.

Neben der Repression wird auch die Derepression genetisch kontrolliert. Für einen Derepressionsausfall der Enzyme des Glyoxylatzyklus, der Glucogenese und der Maltaseverwertung konnten die Gene CAT1, CAT3, CCR2 und CCR3 verantwortlich gemacht werden (Zimmermann et al., 1977 und Ciriacy, 1977). Bei der Derepression scheint cAMP eine Rolle zu spielen. Mahler und Lin (1978) konnten durch exogene cAMP-Gabe eine Derepression der delta-Aminolävulinat-Dehydratase auslösen, die für die Regulation der Häm-Synthese verantwortlich ist.

Es wird deutlich, daß Glucose-Repression und Derepression bei Saccharomyces cerevisiae durch ein sehr komplexes System gesteuert werden, dessen molekularer Mechanismus zur Zeit noch nicht bekannt ist.

1.2. Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung

Der schnelle Aktivitätsverlust einiger Enzyme zusätzlich zur Repression nach Gabe von Glucose wurde von Holzer (1976) Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung genannt. Die Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung wurde zuerst von Witt et al. (1966a) für die Malat Dehydrogenase gefunden. Sie konnten durch Glucose-Gabe zu dereprimierten Hefezellen eine starke Abnahme der Malat Dehydrogenase-Aktivität nachweisen. Im Gegensatz zu anderen reprimierbaren Enzymen, wie Alkohol Dehydrogenase und Malat Synthase ist dieser schnelle Aktivitätsverlust der Malat Dehydrogenase nicht allein durch Repression der Neusynthese zu erklären. Weitere Untersuchungen ergaben, daß nur das cytoplasmatische Isoenzym der Malat Dehydrogenase inaktiviert wird (Witt et al., 1966b).

Auch für die Isocitrat Lyase (Duntze et al., 1968), für die Fructose-1,6-bisphosphatase (Gancedo, 1971) und für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (Haarasilta und Oura, 1975; Gancedo und Schwerzmann, 1976) wurde eine ähnliche Inaktivierung beschrieben. Die physiologische Bedeutung für die Hefezelle, gerade diese Enzyme zusätzlich zur Repression zu inaktivieren, wird darin gesehen, daß dadurch die Bildung eines Energie verbrauchenden "futile cycle" zwischen den glucogenetischen und den glycolytischen Enzymen verhindert wird (siehe Abb. 1).

Außer durch Glucose kann die Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung auch durch andere Hexosen wie Fructose und Mannose, sowie durch die Disaccharide Saccharose und Maltose ausgelöst werden (Duntze et al., 1968).

Bei Zugabe von Cycloheximid als Proteinsyntheseinhibitor vor der Inaktivierung zeigten Fructose-1,6-bisphosphatase und Phosphoenolpyruvat Carboxykinase ein normales Inaktivierungsverhalten, während eine Inaktivierung der Malat Dehydrogenase verhindert wurde (Ferguson et al., 1967). Die daraus abgeleitete Annahme,

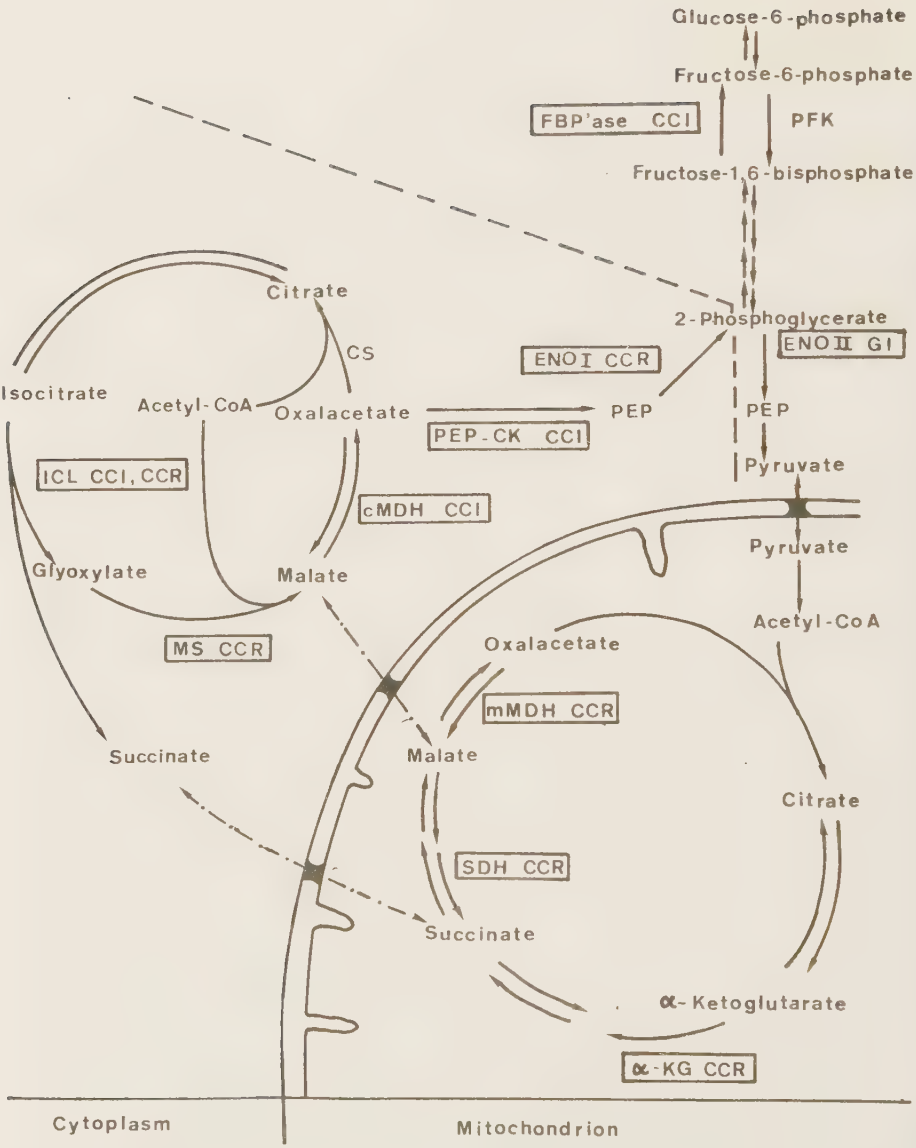


Abb. 1: Schema für die Regulation von Glykolyse und Glucogenese durch Kohlenstoff-Katabolit-Repression (CCR), Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung (CCI) und Glucose-Induktion (GI) nach Neeff und Mecke (1977):
CS Citratlyase, ENOI + ENOII Enolase I bzw.II, FBPase Fructose-1,6-bisphosphatase, ICL Isocitratlyase, KG alpha Ketoglutarat Dehydrogenase, cMDH + mMDH cytoplasmatische bzw. mitochondriale Malat Dehydrogenase, MS Malat Synthase, PEP Phosphoenolpyruvat, PEP-CK Phosphoenolpyruvat Carboxykinase, PFK Phosphofructokinase, SDH Succinat Dehydrogenase

daß für die Malat Dehydrogenase-Inaktivierung eine de novo Proteinsynthese notwendig ist, wurde jedoch durch Versuche mit tryptophanauxotrophen Mutanten (Duntze et al., 1968), mit Hungerzellen (Neeff und Mecke, 1977) und mit temperatursensitiven Mutanten (Neeff und Heer 1978) widerlegt. Die Hemmung der Malat Dehydrogenase-Inaktivierung scheint somit auf einen unspezifischen Effekt des Cycloheximid durch Schädigung der Glykolyse zurückzuführen zu sein (Greig et al., 1958; Entian, 1979).

Für die Auslösung der Katabolit-Inaktivierung ist somit keine de novo Proteinbiosynthese nötig. Inaktivierte Enzyme können jedoch nur durch eine Neusynthese wiedergewonnen werden, d.h. die Katabolit-Inaktivierung ist ein irreversibler Prozeß. Zu diesem Schluß kam man aus entsprechenden Experimenten mit tryptophanauxotrophen Mutanten, und mit Hefezellen, die ohne C-Quelle nach der Inaktivierung keinen Anstieg der Malat Dehydrogenase-Aktivität mehr zeigten (Duntze et al., 1968). Erhärtet wurde diese Annahme durch immunologische Tests von Neeff et al. (1978) und Mecke und Neeff (1978). Sie konnten mit spezifischen Antikörpern gegen cytoplasmatische Malat Dehydrogenase allein, sowie mit Antiseren, die mit mitochondrialer Malat Dehydrogenase und mit cytoplasmatischer Malat Dehydrogenase kreuzreagierten, einen parallelen Abfall des Antigen-Antikörper-Präzipitats zum Aktivitätsabfall der Malat Dehydrogenase zeigen. Eine inaktivierte, modifizierte Malat Dehydrogenase konnte also mit Antikörpern nicht nachgewiesen werden. Diese Ergebnisse lassen als Mechanismus der Katabolit-Inaktivierung einen proteolytischen Abbau der Malat Dehydrogenase als sehr wahrscheinlich erscheinen.

Ähnliche Experimente führten Funayama et al. (1980) für die Fructose-1,6-bisphosphatase und Müller et al. (1981) für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase durch.

Im Gegensatz dazu konnten Lenz und Holzer (1980) bei stationären Hefezellen für die Glucose induzierte Inaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase zwei Phasen nachweisen. Die innerhalb der ersten 3-10 Minuten ablaufende schnelle Inaktivierung auf ca 50% der Ausgangsaktivität ist auch bei Zugabe von Cycloheximid voll reversibel. Erst die anschließende langsame Inaktivierung (2. Stufe) ist irreversibel. Tortora et al. (1981) beobachteten, daß die schnelle Inaktivierung nicht mit einem Absinken der Menge an immunpräzipitierbarem Enzym einhergeht, was auf eine kovalente Modifikation der Fructose-1,6-bisphosphatase als Mechanismus für die schnelle Phase der Inaktivierung hinweist.

Versuche von Müller und Holzer (1981) und Mazón et al. (1982a) konnten dies bestätigen. Nach Fällen der Fructose-1,6-bisphosphatase mit spezifischen Antikörpern aus ^{32}P orthophosphat markierten Hefe-Rohextrakten und Isolierung des Enzyms durch präparative Elektrophorese konnte die Inkorporation von ^{32}P in die Fructose-1,6-bisphosphatase bestimmt werden. Dabei zeigten auf Acetat angezogene Zellen nur sehr wenig markiertes Enzym, während schon 3 Minuten nach Zugabe von Glucose zu solchen Zellen die Radioaktivität des Immunkomplexes stark anstieg. Weitere Untersuchungen ergaben, daß dabei ein Serinrest der Fructose-1,6-bisphosphatase phosphoryliert wurde. In glucosefreiem Medium wurde das seringebundene Phosphat wieder abgespalten. Die Reversibilität der schnellen Phase der Fructose-1,6-bisphosphatase-Inaktivierung geht möglicherweise auf ein Zusammenspiel von Proteinkinase und Phosphatase zurück.

Purwin et al. (1982) und Londesborough (1982) wiesen *in vivo* bzw. in zellfreien Hefeextrakten eine cAMP-, ATP-, und Mg^{2+}-abhängige Inaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase nach.

Pohlig et al. (1983) konnten die Fructose-1,6-bisphosphatase *in vitro* nur durch Phosphorylierung mit einer cAMP-abhängigen Proteinkinase, nicht aber mit zwei weiteren cAMP-unabhängigen Proteinkinasen inaktivieren.

Zur Auslösung der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung ist offenbar ein Anstieg des cAMP-Spiegels nach Glucose-Zugabe nötig. Mazón et al. (1982b) beobachteten, daß auch Protonen-Ionophore eine Inaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase auslösen können. Sie nahmen deshalb an, daß die Depolarisierung der Cytoplasmamembran einen Anstieg der cAMP-Konzentration bewirken könnte.

Coffein steigert unter dereprimierenden Bedingungen über die Hemmung der Phosphodiesterase den Ausgangs - Spiegel an cAMP. Dadurch konnte der Einfluß des cAMP´s auf die Inaktivierung weiter überprüft werden. Durch Vorinkubation mit verschiedenen Konzentrationen an Coffein war nur noch eine schwache Inaktivierung der 3 Enzyme Malat Dehydrogenase, Fructose-1,6-bisphosphatase und Phosphoenolpyruvat Carboxykinase zu sehen (Tortora et al., 1982).

Dagegen zeigte eine Adenylatcyklase-Mutante keine Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung (Tortora et al., 1983). Dieser Effekt konnte durch externe Gabe von cAMP teilweise wieder aufgehoben werden. cAMP-Gabe bewirkt allein nur eine Inaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase, nicht jedoch der Malat Dehydrogenase und der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (Tortora et al., 1984). Unter diesen Umständen ist die Inaktivierung der Fructose 1,6-bisphosphatase über einen Zeitraum von 2 Stunden voll reversibel. Erst bei gleichzeitiger Gabe von cAMP und Glucose zu den Adenylatcyklase-Mutanten wurden alle drei Enzyme inaktiviert. Entsprechend dem Verhalten bei Wildtypstämmen war die Fructose 1,6-bisphosphatase-Inaktivierung nur während der ersten 5-30 Minuten reversibel.

Ein ähnliches Verhalten in Bezug auf die Reversibilität zeigten Untersuchungen von Glykolyse-Mutanten (Dröll, 1981 und Entian et al., 1983). Bei Mutanten, die nur die Fructose-1,6-bisphosphatase inaktivieren konnten, blieb diese Inaktivierung immer reversibel.

So inaktivierten eine Pyruvatkinase-Mutante unter aeroben und eine Phosphoglycerat Kinase-Mutante unter anaeroben Bedingungen die Malat Dehydrogenase nicht mehr und die Fructose-1,6-bisphosphatase nur noch mit der reversiblen Phase.

Eine weitere Mutante, die das Adenylatcyklase-Bedürfnis durch Veränderung der cAMP-abhängigen Proteinkinase umgehen kann, zeigte bei Glucose-Gabe ein normales Inaktivierungsverhalten. Danach muß außer dem Anstieg von cAMP durch Zugabe von Glucose noch ein weiterer Effekt ausgelöst werden, der für die Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung notwendig ist. Das stimmt auch damit überein, daß cAMP selbst nur den ersten, reversiblen Teil der Inaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase auslösen kann.

Eine wichtige Rolle bei der Inaktivierung kommt auch dem Metaboliten Fructose-2,6-bisphosphat zu. Nur in Hefezellen, die auf einem glucosehaltigen Medium wuchsen, konnte von Lederer et al. (1981) Fructose-2,6-bisphosphat gefunden werden. Andere Zellen bildeten erst nach Zugabe von Glucose Fructose-2,6-bisphosphat. Furuja et al. wiesen 1982 auch die entsprechende Fructose 6-phosphat 2-Kinase in Saccharomyces cerevisiae nach. Gancedo et al. (1983) zeigten, daß die Phosphorylierung der Fructose-1, 6-bisphosphatase durch Fructose-2,6-bisphosphat stark stimuliert wird. Dieser Metabolit könnte über einen allosterischen Mechanismus die Fructose-1,6-bisphosphatase dem Angriff der cAMP-abhängigen Proteinkinase leichter zugänglich machen.

Fructose-2,6-bisphosphat kann die Phosphofructokinase schon in sehr geringen Konzentrationen aktivieren und die Fructose-1, 6-bisphosphatase inaktivieren. Es ist somit eine Substanz,die die Glykolyse stark stimuliert und gleichzeitig einen "futile cycle" dieser Enzyme verhindert.

Zusammenfassend kann also die erste Phase der Fructose 1,6-bisphophatase Inaktivierung so beschrieben werden: durch Glucose-Gabe steigt die cAMP-Konzentration kurzfristig an,

gleichzeitig wird Fructose-2,6-bisphosphat gebildet, welches einerseits die Phosphofructokinase aktiviert und andererseits die Fructose-1,6-bisphosphatase zu einem besseren Substrat für die cAMP-abhängige Proteinkinase macht. Die Proteinkinase phosphoryliert die Fructose-1,6-bisphosphatase an einem Serinrest, wodurch eine sofortige Senkung der Aktivität der Fructose-1,6-bisphosphatase um 40-50% erreicht wird.

Alle diese Prozesse sind noch reversibel. Erst danach setzt die irreversible Proteolyse ein, die auch für die Malat Dehydrogenase und die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase postuliert werden. Hierbei könnte die phosphorylierte Fructose-1,6-bisphosphatase ein besseres Substrat für die Proteolyse sein. Es konnten jedoch weder für die Malat Dehydrogenase noch für die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase eine Phosphorylierung gefunden werden (Mazoń et al., 1982 und Tortora et al., 1984).

Eine *de novo* Synthese der proteolytischen Enzyme nach Glucose-Zugabe kann ausgeschlossen werden, da eine Proteinsynthese während der Katabolit-Inaktivierung nicht erforderlich ist. Die notwendige Regulation der proteolytischen Inaktivierung kann also nur durch Aktivierung inaktiver Vorstufen oder durch Kompartimentierung proteolytischer Enzyme erreicht werden. (Review über kontrollierte Proteolyse siehe Holzer und Heinrich, 1980).

Die in *Saccharomyces cerevisiae* bekannten Proteasen wurden auf eine Beteiligung an der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung untersucht. Hansen et al. (1977) hatten zeigen können, daß durch die Katabolit-Repression auch die Synthese der Proteasen A, B und der Carboxypeptidase Y beeinflußt wird. Jusic et al. (1976) und Neeff et al. (1974) beobachteten, daß die cytoplasmatische Malat Dehydrogenase bei *in vitro* Versuchen sehr sensitiv gegen die Protease B ist. Auch die Fructose-1,6-bisphosphatase wurde *in vitro* mit einer aus Hefe isolierten Fraktion, die vermutlich eine Protease enthielt, inaktiviert (Molano und Gancedo, 1974). Ander-

erseits konnten Zubenko et al. (1979a,b) und Wolf und Ehman (1979) durch Isolierung einer Strukturgenmutante der Protease B (die Mutante hat noch die Protease A und die Carboxypeptidase Y) zeigen, daß in dieser Mutante alle drei Enzyme normal inaktiviert wurden. Die Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung ist somit in vivo von der Protease B unabhängig.

Inzwischen wurde eine Reihe weiterer Proteasen aus Hefe isoliert (Wolf, 1982; Achstetter et al., 1981; 1982a,b; 1984a,b; Frey und Röhm, 1978; Suarez et al., 1981), deren Einfluß auf die Katabolit-Inaktivierung teilweise noch überprüft werden muß.

Die Inaktivierung der alpha-Isopropylmalat Synthase in permeabilisierten Zellen (Brown et al., 1975) und die Inaktvierung der Fructose-1,6-bisphosphatase in vivo (Großmann, 1980) konnten durch Zugabe von Phenylmethylsulfonylfluorid, einem Proteinaseinhibitor, verhindert werden. Aber auch hier konnte bislang keine bestimmte Protease für die Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung verantwortlich gemacht werden.

Gezielte genetische Untersuchungen der Katabolit-Inaktivierung lagen bisher noch nicht vor, da ein geeignetes Selektionssystem fehlte. Eine Mutante von van de Poll et al. (1974) und van de Poll und Schamhart (1977), die nicht mehr auf Glucose wachsen kann, konnte die Fructose-1,6-bisphosphatase nicht inaktivieren. Schamhart et al. zeigten 1977, daß die Fructose-1,6-bisphosphatase in der Mutante nach Saccharose-Zugabe inaktiviert wird. Der völlige ATP-Verlust durch Glucose-Zugabe deutete auf einen "futile cycle" hin, so daß die Störung des Glucose-Stoffwechsels als Ursache des Inaktivierungsausfalls angenommen wurde.

Alle bisherigen Ergebnisse sprechen für einen gemeinsamen Mechanismus bei der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung durch einen proteolytischen Abbau der Malat Dehydrogenase, der Fructose 1,6-bisphosphatase und der Phosphoenolpyruvat Carboxykinase. Nur bei der Fructose-1,6-bisphosphatase konnte eine vorrangehende Modifizierung mit Aktivitätsverlust nachgewiesen werden.

1.3. Aufgabenstellung

Weitere Aussagen über den molekularen Mechanismus der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung können durch Vergleich von Wildtyp- mit Mutanten-Zellen, die einen Ausfall dieser Inaktivierung zeigen, gewonnen werden. Deshalb sollte im Rahmen dieser Arbeit ein Selektions- oder Screening-System zur Isolierung solcher Mutanten ausgearbeitet werden. Parallel wurden verschiedene Hefe-Species auf Unterschiede in der Katabolit-Inaktivierung untersucht. Die Verwandtschaft dieser Hefe - Species wurde durch vergleichende DNA-Hybridisierung überprüft. Die Hefe-Species und die durch das Screening isolierten Mutanten konnten durch Bestimmung der Enzym- und Metabolitspiegel während der Inaktivierung näher charakterisiert werden.

2. Material und Methoden

2.1. Verwendete Stämme

Haploide Hefestämme von *Saccharomyces cerevisiae*

catl.S3-14A	*a*			*his4*			$MAL2\text{-}8^C$	*MAL3*	*SUC3*
H38-4B	*alpha*			*his4*		*leu1*	$MAL2\text{-}8^C$	*MAL3*	*SUC3*
HEX2.0-51B	*a*	*ade1*	*trp1*	*his4*					
HEX2.0-61D	*alpha*	*ade1*	*trp1*	*his2*	*his4*	*met14*			

Andere Wildtyp-Hefestämme

Klyveromyces lactis CBS683
Candida utilis NCYC737
Candida parapsilosis CBS604

Die verwendeten Hefestämme leiten sich von Stämmen des Department of Genetics der University of Washington, Seattle, des Yeast Genetic Stock Center, Donner Laboratories, University of California, Berkeley, und des Centraalbureau voor Schimmelcultures, Delft ab.

Gensymbole: Mit *a* und *alpha* sind die Paarungstypen bezeichnet. *ade1*, *his2*, *his4*, *leu1*, *met14*, und *trp1* verursachen ein Bedürfnis der entsprechenden Aminosäuren, bzw. von Adenin. $MAL2\text{-}8^C$ erlaubt eine induktorunabhängige Maltasesynthese. Das Gen unterliegt aber weiterhin der Glucose-Repression (Zimmermann und Eaton, 1974). Die eng gekoppelten Gene *MAL3* und *SUC3* ermöglichen die Synthese von Maltase bzw. Invertase.

2.2 Chemikalien

Die meisten Chemikalien wurden von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma (München), Serva (Heidelberg) und Boehringer (Mannheim)

bezogen. Hefeextrakt, Bacto Pepton, Yeast Nitrogen Base und Agar stammten von Difco (Detroit). Das Argon wurde von der Firma Mast (Tübingen) geliefert.

2.3. Kulturmedien

Vollmedien bestanden aus 1% Hefeextrakt, 2% Bactopepton (YEP-) und 2% D-Glucose, bzw. 2% Ethanol oder 2% Glycerin. Teilweise wurde als Proteinsyntheseinhibitor Cycloheximid zugegeben. Synthetisches Medium enthielt 0.67% Yeast Nitrogen Base, folgende Aminosäuren: 10mg/l Adenin, 20mg/l Arginin, 20mg/l Histidin, 30mg/l Isoleucin, 30mg/l Leucin, 20mg/l Methionin, 50mg/l Phenylalanin, 30mg/l Threonin, 20mg/l Tryptophan, 30mg/l Tyrosin, 20mg/l Uracil und 30mg/l Valin, sowie als C-Quelle 2% Glucose oder bei Verwendung als Derepressionsmedium 0,3% Natriumacetat. Zur Herstellung der Agarplatten wurde zu dem jeweiligen Medium jeweils 1,5% Agar zugegeben. Sporulationsmedium enthielt 1% Kaliumacetat.

Alle Medien wurden im Autoklav 20 Minuten bei 121°C sterilisiert.

2.4. Puffer

Häufig verwendete Puffer wurden folgendermaßen hergestellt und bezeichnet:
Glycin/Hydrazin-Puffer pH 9,5: 7,5g Glycin, 5,2g Hydrazinsulfat, 0,2g EDTA, 4,08g NaOH ad 100ml dest. Wasser
Imidazol-Puffer (50mM) pH 7,0: 3,4g Imidazol, 37,2mg EDTA, 2,03g Magnesiumchlorid, 7,46g Kaliumchlorid, mit HCl auf pH 7,0 ad 1000ml dest. Wasser
KPP: 0,1M Kaliumphosphatpuffer pH 6,5
Scintillationsmix: 650ml Toluol p.A., 350ml TritonX-100, 3g PPO (2,5-Diphenyloxazol) und 75mg POPOP (1,4-Bis(5-Phenyloxazol-2-yl)-benzol)
TE-Puffer: 10mM Tris/HCl, 1mM EDTA pH 8,0
TRAP-Puffer: 50mM Triethanolamin/HCl pH7,5

2.5. Anzucht der Hefen, Einzelzellausstrich

Die Hefen wurden von einer Vorkultur angeimpft und bei 30°C geschüttelt. Teilweise wurde mit Glucotest (Boehringer, Mannheim) der Rest-Glucosegehalt bestimmt.

Die Zelldichte wurde durch Trübungsmessung direkt im Glas am Klettphotometer abgelesen, oder nach Verdünnung bei 600nm an einem Zweistrahl-Photometer bestimmt. Die Zellzahl wurde durch Auszählen in der Neubauer-Zählkammer ermittelt.

Zum Einzelzellausstrich wurden die Zellen auf 2-4 x 10^3 Zellen/ml verdünnt. Auf eine Agarplatte wurden 0,1 ml dieser Verdünnung pipettiert und mit einem Drigalski-Spatel gleichmäßig verteilt. Nach 3-5 Tagen bei 30°C waren Kolonien gewachsen.

2.6. Derepressions-, Inaktivierungs- und Reaktivierungs-Bedingungen

Zur Derepression wurden die in YEP-Glucose angezogenen Zellen (Zelltiter $5x10^7$ - $5x10^8$ /ml) abzentrifugiert, zweimal mit KPP-Puffer gewaschen und im gleichen Volumen synthetischen Derepressionsmedium aufgenommen. Eine vollständige Derepression war nach 4-5 Stunden erreicht, so daß routinemäßig 5 Stunden dereprimiert wurde.

Die Inaktivierung wurde durch Zugabe von Glucose-Lösung bis zu einer Endkonzentration von 0,1M D-Glucose zu dereprimierten oder in YEP-Ethanol angezogenen Zellsuspensionen gestartet. Proben à 5ml zur Enzymbestimmung wurden kurz vorher und dann zu den jeweiligen Zeiten entnommen, 30 Sekunden bei 5000 Upm abzentrifugiert, zweimal mit KPP-Puffer gewaschen und bis zum Zellaufschluß tiefgefroren (-20°C).

Bei anaerober Inaktivierung wurde die Zellsuspension mit einer Wasserstrahlpumpe 10 Minuten entgast. Das dabei entstehende Vakuum wurde mit 99,99% Argon aufgefüllt. Anschließend wurde 1 Minute lang ein kräftiger Argon-Strom über ein in die Suspension ragendes Glasrohr eingeleitet und der Kolben bei einem geringen Überdruck an Argon verschlossen. Zur Adaption der Hefen und zum Verbrauch des restlichen Sauerstoffs wurde 10 Minuten inkubiert, bevor durch den Gummistopfen die entgaste 20% D-Glucose-Lösung eingespritzt wurde. Durch den schwachen Überdruck wurde ein Eindringen von sauerstoffhaltiger Luft verhindert und die Probenentnahme ermöglicht. Bei Öffnen des Ventils wurde durch den Überdruck die Hefesuspension durch das Glasrohr heraufgepreßt, und die Probe konnte ohne Sauerstoffkontakt der restlichen Hefekultur entnommen werden.

Zur Reaktivierung wurde nach definierten Zeiten der Inaktivierung 50-100 ml Hefekultur entnommen und in der Christ-Labofuge III ca 1Minute bei 5000 Upm abzentrifugiert, wobei in dem Zentrifugenglas 5 ml gefrorener KPP-Puffer vorlag, um die Suspension sofort abzukühlen. Dann wurden die Hefezellen solange mit eiskaltem KPP-Puffer gewaschen, bis keine Glucose mehr nachzuweisen war (Glucotest, Boehringer, Mannheim). Nun wurden die Zellen in der gleichen Menge Derepressionsmedium aufgenommen und erneut bei 30°C geschüttelt. Der ganze Vorgang dauerte ca. 10 Minuten. Deshalb wurde davor und danach jeweils eine Probe entnommen. Die Reversibilität wurde maximal 6 Stunden verfolgt. Um einen Anstieg der Enzymaktivität auf Grund der Proteinneusynthese auszuschließen, wurde bei einem Teil der Versuche zu dem Derepressionsmedium 10ppm bzw 1000ppm Cycloheximid als Proteinsynthese-inhibitor zugesetzt.

2.7. Gewinnung der Rohextrakte

2.7.1. Rohextrakte zur Enzymbestimmung

1 g Glasperlen (Durchmesser 0,5 mm) wurde zu den tiefgefrorenen Zellproben gegeben, und die Suspension 1 min auf einem Reagenzglasschüttler (Heidolph) geschüttelt (Ciriacy, 1975). Die Aufschlußrate, bestimmt durch mikroskopische Kontrolle, betrug über 95%. Nach Zugabe von 1-1,5ml KPP wurden die Glasperlen und die Zelltrümmer 15 min bei 5000Upm abzentrifugiert. Der aus dem Überstand gewonnene Rohextrakt wurde direkt zur Protein- und Enzymbestimmung eingesetzt.

2.7.2. Rohextrakte zur Metabolitbestimmung

Die Proben der Zellkulturen (meist 50 ml) wurden abzentrifugiert, wobei im Reagenzglas zur sofortigen Kühlung 5 ml gefrorener Puffer vorlag. Der Überstand wurde abgegossen, die Zellkörper kurz durch einen Vortex aufgewirbelt und dann sofort mit siedendem Ethanol versetzt. Dadurch platzen die Zellen und die Enzyme werden denaturiert, so daß keine oder nur geringe Metabolitverschiebungen auftreten sollten. Die Aufarbeitungszeit betrug 30-60 Sekunden.

Das Ethanol wurde in einem Exsikkator über Nacht verdampft. Der Rückstand wurde in 2-5 ml KPP aufgenommen und die Zelltrümmer 15 min bei 5000Upm abzentrifugiert. Aus dem Überstand wurden die Metabolite sofort oder nach Einfrieren bestimmt.

2.7.3. Rohextrakte zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes

Proben von 1 ml Zellsuspension wurden in einem Eppendorfcup 5-10 Sekunden abzentrifugiert, dekantiert, mit 1 ml Essigsäure (p.A.) versetzt, kurz geschüttelt und bei -80°C eingefroren. Zur vollständigen Zerstörung der Zellen wurden die Proben dreimal aufge-

taut und wieder eingefroren. Anschließend wurden sie durch Anlegen eines Vakuums in einem Exsikkator lyophilisiert. Der Rückstand wurde in 0,6ml bidest. Wasser so weit als möglich gelöst. Die Zelltrümmer wurden 10min abzentrifugiert und der Überstand zur cAMP-Bestimmung eingesetzt (modifiziert nach Nazar et al., 1970; Tortora et al., 1982).

2.8. Protein-, Enzym- und Metabolitbestimmung

2.8.1. Proteinbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der Rohextrakte wurden nach der Mikrobiuret-Methode von Zamenhoff (1957) bei 290nm bestimmt. Zu 1ml KPP wurden 0,1ml Rohextrakt und 0,5ml Mikrobiuret - Reagenz (0,21% Kupfersulfat in 7,9M NaOH) pipettiert. Nach 10min wurde die Extinktion bei 290nm gegen einen Leerwert gemessen. Es wurden Doppelproben bestimmt. Die Eichgerade mit Rinderserumalbumin war bis 2 OD linear.

2.8.2. Aktivitätsbestimmung der Enzyme

Die Aktivitäten wurden im optischen Test bei 30°C durch die Zu- bzw. Abnahme der NADH- bzw. NADPH-Extinktion gemessen. Mit einem Eppendorf-Kompensationsschreiber wurde der lineare Anstieg der Extinktion pro Minute ermittelt und daraus die Volumen- oder spezifische Aktivität errechnet.

Fructose-1,6-bisphosphatase (E.C. 3.1.3.11):
Die Aktivität wurde nach Gancedo und Gancedo (1971) bestimmt. Das entstehende Fructose 6-phosphat wurde zu Glucose 6-phosphat isomerisiert und von der Glucose 6-phosphat Dehydrogenase unter Bildung von NADPH zu 6-Phosphogluconat oxidiert.

Testgemisch: 0,25 mM $NADP^+$
10 mM Magnesiumchlorid
100 mM Kaliumchlorid
50 mM Imidazol /HCl pH 7,0
0,5 U Glucose 6-phosphat Dehydrogenase
0,5 U Phosphoglucose Isomerase
0,1 ml Rohextrakt

Falls nötig wurde der Vorlauf abgewartet und dann mit 0,1 ml 12mM Fructose-1,6-bisphosphat gestartet. Die Extinktion wurde bei 334 nm bestimmt.

Malat Dehydrogenase (E.C. 1.1.1.37):
Die Aktivität wurde nach Wolfe und Neilands (1956) bei pH 9,5 bestimmt.
Testgemisch: 2,5 mM NAD^+ (jeweils frisch zugeben)
1 M Glycin
2,5 M Hydrazinsulfat
0,18 M EDTA
1 M NaOH
0,01ml Rohextrakt
Start mit 0,1 ml L-Natriummalat (0,5M)
Die Extinktion wurde bei 366nm gemessen.

Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (E.C. 4.1.1.31):
Die Aktivität wurde nach Hansen et al. (1976) bestimmt.
Testgemisch: 0,45 mM NADH
1,25 mM ADP
2 mM Glutathion
2 mM Manganchlorid
50 mM Natriumhydrogencarbonat
100 mM Imidazol /HCl pH 6,6
3 U Malat Dehydrogenase
0,1 ml Rohextrakt
Start mit 0,1 ml Phosphoenolpyruvat (25 mM)
Die Extinktion wurde bei 366nm gemessen.

Alle anderen Enzyme wurden nach Bergmeyer (1970) bzw. Fröhlich (1982) bestimmt.

2.8.3. Metabolitbestimmung

Die Glycolyse-Metabolite wurden über direkte enzymatische Tests bei 340nm am Beckman-Zweistrahlphotometer nach Bergmeyer (1970) bestimmt. Dabei wurden die jeweiligen Enzyme mit 0,5U/ml eingesetzt. Üblicherweise wurde die Messung nach 10-20min abgebrochen. Da Endpunktsbestimmungen gemacht wurden, konnte auch ein weiterer Metabolit im gleichen Testansatz bestimmt werden. Im einzelnen wurde folgendermaßen vorgegangen:

Glucose 6-phosphat, Fructose 6-phosphat, ATP, Glucose 1-phosphat:

1 ml	NADP (0,25mM) in 0,1M TRAP-Puffer pH 7,6	
0,1 ml	Rohextrakt	
0,001ml	Glucose 6-phosphat Dehydrogenase (0,5U)	→ Glc6P
0,001ml	Phosphoglucoseisomerase (0,5U)	→ Frc6P
0,1 ml	D-Glucose (5mM)	
0,001ml	Hexokinase (0,5U)	→ ATP
0,001ml	Phosphoglucomutase	→ Glc1P

Glycerinaldehyd 3-phosphat, Dihydroxyacetonphosphat, Fructose-1,6-bisphosphat:

1 ml	NADH (0,25mM) in 0,1M TRAP-Puffer pH 7,6	
0,1 ml	Rohextrakt	
0,001ml	Glycerin 3-phosphat Dehydrogenase (0,5U)	→ DHAP
0,001ml	Triosephosphat Isomerase (0,5U)	→ GAP
0,005ml	Aldolase (0,5U)	→ FDP

1,3Diphosphoglycerat, 3Phosphoglycerat, 2Phosphoglycerat:

1 ml	NADH (0,25mM) in 0,1M Pyrophosphat-Puffer pH 7,9	
0,1 ml	Rohextrakt	
0,001ml	Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase	→ 1,3DPG
0,1 ml	ATP (1mM) + Mg Cl (5mM)	
0,001ml	3-Phosphoglyceratkinase	→ 3PG
0,001ml	Phosphoglyceratmutase	→ 2PG

Pyruvat, Phosphoenolpyruvat:

1 ml NADH (0,25mM) in 0,1M TRAP-Puffer pH 7,6
0,1 ml Rohextrakt
0,001ml Lactat Dehydrogenase ⟶ Pyr
0,1 ml ADP (1mM) + $MgCl_2$ (5mM)
0,001ml Pyruvatkinase ⟶ PEP

Pyruvat, ADP:

1 ml NADH (0,25mM) in 0,1M TRAP-Puffer pH 7,6
0,1 ml Rohextrakt
0,001ml Lactat Dehydrogenase ⟶ Pyr
0,1 ml Phophoenolpyruvat
0,001ml Pyruvatkinase ⟶ ADP

cAMP-Bestimmung

Hierfür wurde ein Testset von Boehringer Mannheim verwendet, das auf einer Methode von Gilmann (1970) beruht. In ein Eppendorf-Cup wurden 0.05 bis 0.1 ml Rohextrakt, 0,05 ml Natriumacetat-Puffer pH 4,0 und 0,02ml (^{3}H)cAMP (0,001mCi/ml) pipettiert. Nach Mischen wurde 0.02ml cAMP-bindendes Protein zugegeben. Durch mehrmaliges Nachspülen der Pipettenspitze wurde das Protein möglichst quantitativ ins Testgemisch überführt. Die Lösung wurde gemischt und 100min im Eis/Wasserbad inkubiert. Nach Zugabe von 0,5ml kalter Ammoniumsulfatlösung (3,8mol/l) wurde zur vollständigen Fällung des Proteins 10min bei 0°C stehengelassen. Der Niederschlag wurde 4min abzentrifugiert, mit 0,5ml Ammoniumsulfatlösung (2,7mol/l) gewaschen und der Überstand quantitativ abpipettiert. Dann wurde der Niederschlag in 1,2ml bidest. Wasser gelöst. 1ml davon wurde mit 10ml Scintillationslösung versetzt und am Scintillationszähler ausgezählt. Für jede Testreihe wurde ein Leerwert und Standardkonzentrationen mitgeführt.

Berechnung: $I = I_{0\ Standard} - I_{Leerwert}$ I ≙ Zählrate in cpm

$Ix = I_{Probe} - I_{Leerwert}$

I_0/I_x wird gegen pmol cAMP aufgetragen.

Aus der Eichgeraden wurde die Menge an cAMP bestimmt.

2.9. Genetische Methoden

2.9.1. Mutagenisierung

Die Zellen wurden in 5ml YEP-Ethanol angezogen, steril abzentrifugiert und zweimal mit KPP gewaschen. Dann wurden sie in 5ml KPP aufgenommen und mit 1-2% Ethylmethansulfonat bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Je nach gewünschter Überlebensrate wurden nach 30min bis 4h die Zellen abzentrifugiert, zweimal mit KPP gewaschen und zur Mutationsausprägung in 5-10ml YEP-Ethanol bei 30°C erneut geschüttelt bis sich die Zelldichte verdoppelt hatte. Das wurde am Klett-Photometer kontrolliert.

2.9.2. Kreuzung

Zur Kreuzung wurden 2 Stämme mit verschiedenen Paarungstypen und komlementären Auxotrophien auf eine YEP-Glucose-Platte ausgestrichen und vermischt. Zur Isolierung der diploiden Zellen wurde nach 1-2 Tagen auf Minimalmedium gestempelt.

2.9.3. Sphäroplastenfusion

Die Sphäroplastenfusion wurde nach Solinger et al. (1977) durchgeführt. Hierbei wurden zuerst die Hefezellen geerntet, gewaschen und in sterilem Protoplasten-Puffer (0,8M Sorbitol in 0,1M KPP pH 7,5) suspendiert, so daß ca. 250mg Naßgewicht Zellen/ml erhalten wurden. Zu 3ml wurden 0,005ml Mercaptoethanol und 0,4mg Zymolyase 5000 ,Kirin Brewery, Japan, gegeben. Nach 1-2h bei 30°C wurden die Sphäroplasten vorsichtig bei 1000Upm 10min zentrifugiert und 5 Mal mit 10ml Protoplastenpuffer gewaschen. Das Sediment wurde in 10ml Protoplastenpuffer aufgenommen und mit der Zählkammer wurde die Zellzahl bestimmt. Anschließend wurden je gleiche Zellmengen ($5x10^7$-$5x10^8$) der verschiedenen Stämme gemischt und bei 1000 Upm abzentrifugiert. Zur eigentlichen Fusion wurden die Sphäroplasten in 10ml steriler Fusionslösung, die 10mM Tris/HCl

pH 7,5, 40% PEG 4000 und 10mM $CaCl_2$ enthielt, suspendiert. Nach 30-120min bei Raumtemperatur wurden 2ml dieser Suspension in 100ml 45°C warmen hypertonen Selektionsagar, der 0,8M an Sorbit und 3% an Agar war, gegeben und in Petrischalen ausgegossen. Nach 4-5 Tagen waren Kolonien zu sehen. Zur Kontrolle wurden die Sphäroplasten der noch nicht fusionierten Stämme ebenfalls in Selektionsagar ausplattiert.

2.9.4. Elektrofusion

Die Sphäroplasten wurden analog wie in 2.9.3. gewonnen, aber in steriler Sortrisca-Lösung (1,2M Sorbit, 10mM $CaCl_2$ in 0,1M Tris/HCl pH 7,5) suspendiert. Sie konnten 1-2Tage bei 0°C aufbewahrt werden. Zur Elektrofusion nach Zimmermann (1982) wurden die Protoplasten mit 1mg/ml Pronase behandelt, gewaschen und in Sortrisca-Lösung aufgenommen. Dann wurden die verschiedenen Stämme 1:1 gemischt (je $1x10^8$ Zellen) und 0,01ml auf die Elekrofusionskammer (Mäanderkammer) gegeben. An den Elektroden wurde eine Wechselspannung von 5-15V und 1000 bzw. 2000 kHz angelegt. Dadurch ordneten sich die Sphäroplasten perlschnurartig zwischen den Elektroden an. Die Fusion erfolgte durch einen oder zwei Doppelpulse im Abstand von 9,9sec. Die Pulsdauer betrug 30-60sec und die Pulsstärke 80V. Für die Fusionsversuche wurde das Fusionsgerät der Arbeitsgruppe Prof. Dr. C. Emeis und E. Schiffer an der RWTH Aachen benutzt. Die Elektrofusion war im Mikroskop direkt sichtbar. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit 1ml steriler Sortrisca-Lösung über einen Trichter von der Kammer in 10ml 45°C warmen Sorbitagar abgespült und in Platten ausgegossen. Nach 3-5Tagen waren Kolonien gewachsen.

2.9.5. Sporulation und Tetradenanalyse

Stationäre Hefezellen wurden abzentrifugiert und in dicker Zellsuspension auf die Sporulationsplatten (1% Kaliumacetat) gegeben (Fowell, 1952). Nach 3 Tagen bei 28°C ließen sich die gebildeten

Asci im Mikroskop erkennen. Zur Tetradensegregation wurden die Asci in 0.5ml sterilem Wasser suspendiert und mit 0,01ml alpha-Glucuronidase/Arylsulfatase (Boehringer, Mannheim) 10 Minuten bei Raumtemperatur angedaut. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10ml Wasser gestoppt. Die Asci wurden durch Zentrifugation geerntet und bei 4°C gelagert. Zur Vereinzelung der Sporen wurden die angedauten Asci auf Wasseragar ausgestrichen und mit einem De Fonbrune Mikromanipulator zerlegt. Die Wasseragarplättchen wurden auf eine YEP-Glucose-Platte abgelegt. Nach 2-4 Tagen waren Kolonien zu sehen.

2.10. Elektrophoretische Methoden

Diskontinuierliche Elektrophorese zur Aktivitätsanfärbung von Enzymen wurde nach Entian et al. (1984) durchgeführt.

Zur Trennung von DNA-Fragmenten im Agarosegel wurde 0,7g Agarose (Betheda Research Laboratories, Neu Isenburg) in 100ml TBE aufgekocht, auf 50°C gekühlt und ein 15cm langes Gel gegossen. Nach einer Stunde wurden die Proben in 30% Glycerin und 0,04% Bromphenolblau aufgetragen. Die Elektrophorese lief mit maximal 1V/cm und wurde beendet, wenn die Bromphenolblaufront noch ca 3cm vom Gelende entfernt war. Das Gel wurde 1h in 0,001% Ethidiumbromidlösung angefärbt (nach Sharp et al., 1973) und auf einem Transilluminator mit 302nm Mischfilter (Ultraviolet Products, San Gabriel, USA) mit einem 10x Rotfilter photographiert. Die Expositionsdauer betrug bei Blende 1:4 30sec auf 20 Din Polaroidnegativfilm Typ 665.

2.11. DNA-Isolierung und DNA-Hybridisierung nach Southern

2.11.1. DNA-Isolierung

Die Zellen wurden durch Zentrifugation geerntet und einmal mit Wasser gewaschen. Je 2g Zellen wurden mit 4ml Zymolyase-Mix (1M Sorbit, 0,1M Natriumcitrat pH7, 60mM EDTA, 2,5mg Zymolyase

20000/10ml, 0,08ml Mercaptoethanol/10ml) 2h bei 37°C inkubiert. Zur Lyse wurde 4ml Lysis-Mix (50mM Tris/HCl pH8, 10mM EDTA, 2% SDS) zugegeben und bei 60°C für 15min erhitzt. Anschließend wurde die DNA durch 1M NaCl im Eisbad gefällt. Der Niederschlag wurde abzentrifugiert und das Pellet über Nacht bei Raumtemperatur in 10ml TE soweit als möglich gelöst. Durch Ausschütteln mit Phenol/ Chloroform wurde das Protein extrahiert; einmal wurde mit Chloroform nachextrahiert.

Die DNA wurde durch Zugabe von 1 Volumen Ethanol gefällt, gewaschen und getrocknet. Teilweise wurde bei diesem Schritt oder einer zweiten Ethanolfällung die DNA direkt auf einen Glasstab gewickelt. Dabei ging man so vor, daß man mit Ethanol so vorsichtig überschichtete, daß sich zunächst eine Phasengrenze zwischen Ethanol und der wässrigen Lösung bildete. An der Phasengrenze fiel die DNA aus und konnte so auf den Glasstab gewickelt werden. Gelang dies, so wurde die DNA nicht weiter gereinigt.

Ansonsten wurde der Niederschlag mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 6ml TE-Puffer gelöst und zur Cäsiumchloridgradientenzentrifugation eingesetzt. Nach 44h bei 40000 Upm im Ti60-Rotor wurde die Zentrifugation gestoppt. Da 1ml Ethidiumbromidlösung (5mg/ml) vor der Zentrifugation zugesetzt wurde, konnte man die DNA-Bande leicht erkennen und diesen Bereich abpumpen (ca. 0,5-1,5ml). Die Lösung wurde fünf Mal mit Isopropanol extrahiert, mit 3,5 Volumen 70% Ethanol gefällt, gewaschen und getrocknet. Dann wurde der Niederschlag in 0,5ml TE gelöst und 20h gegen 5l TE dialysiert, wobei vier Mal der Puffer gewechselt wurde.

2.11.2. Restriktionsverdau und Southern-Blot

Zum vollständigen Verdau wurden ca. 0,015mg DNA mit 1U Restriktionsenzym nach den jeweiligen Testbedingungen der Lieferfirma 12-15h bei 37°C inkubiert. Die so erhaltenen Fragmente wurden durch eine Agarosegelelektrophorese (2.10.) aufgetrennt.

Nach der Methode von Southern (1975), modifiziert nach Maniatis et al. (1982) wurde die DNA auf Nitrocellulosefilter durch Kapillarkräfte übertragen. Das Agarosegel wurde 1 Stunde in Ethidiumbromidlösung angefärbt, zweimal 8 min mit 0,25M Salzsäure, zweimal 15 min mit 1M NaCl in 0,5M Natronlauge und einmal 60 min mit 0,6M NaCl in 1M Tris/HCl pH 7,0 gewaschen. Dadurch denaturiert die DNA und die Stränge trennen sich. Anschließend wurde das Gel auf einen Stapel von 3 Vileda-Schwämmen und 2 Lagen Whatman 3MM-Papier gelegt. Darüber wurde luftblasenfrei der feuchte Nitrocellulose-Filter, 1 Whatman 3MM-Papier und ein Stapel Papierhandtücher geschichtet. Der ganze Stapel befand sich in einer Glasschale, die 1cm hoch mit SSC-Puffer (17mM Trinatriumcitrat, 150mM Natriumchlorid, pH 7,0 mit HCl) gefüllt war. Nach 12-16h war der gesamte Puffer durch das Gel in die Papierhandtücher diffundiert und das Agarosegel dünn zusammengeschrumpft. Die DNA wurde nun durch Trocknen bei 65°C auf dem Nitrocellulosefilter fixiert.

2.11.3. Markierung von DNA

DNA-Plasmide wurden durch eine "nick translation" nach Rigby et al. (1977) radioaktiv markiert. 1µg der zu markierenden DNA wurde in 50mM Tris/HCl pH 8, 5mM Magnesiumchlorid, 50 µg Rinderserumalbumin/ml, je 10µM dCTP, dGTP, dTTP und 10µCi alpha ^{32}P-dATP gelöst und die Translation mit 5U Polymerase I aus Escherichia coli gestartet. Nach 2-3 Stunden bei Raumtemperatur wurde der Ansatz auf eine Sephadex G100-Säule von 2ml Bettvolumen in 0,1% Sarkosyl, 50mM Tris/HCl pH 7,5, 10mM EDTA aufgetragen und in Fraktionen à 0,4ml aufgefangen. Die markierte DNA wurde in der zweiten und dritten Fraktion eluiert, nicht umgesetztes ^{32}P-dATP in der fünften und sechsten Fraktion.

Template-DNA wurde folgendermaßen vermehrt und isoliert. 5ml 2xYT-Medium (0,5% Yeast extract, 0,8% Bactotrypton und 0,5% Natriumchlorid) wurde mit 0,02ml Escherichia coli JM103 Über-

nachtkultur und einem rekombinanten M13-Phagen angeimpft und 6-7h bei 37°C geschüttelt. 1ml Zellen wurden abzentrifugiert und die einsträngigen Bakteriophagen aus 0,8ml Überstand mit 20% Polyethylenglycol 6000, 2M NaCl gefällt. Nach 15 min bei Raumtemperatur wurden die Phagen abzentrifugiert und der Überstand sorgfältig abgesaugt. Die Phagen wurden in 0,2ml TE-Puffer gelöst und mit 0,15ml Phenol extrahiert. Danach wurden die "Templates" mit 0,04ml 5M Natriumperchlorat-Lösung und 0,1ml Isopropanol gefällt, 15 min abzentrifugiert, in 0.3ml 0,3M Natriumacetat gelöst und erneut mit 0,8ml Ethanol gefällt. Der Niederschlag wurde mit 80% Ethanol gewaschen, getrocknet, in 0,03ml Wasser aufgenommen und bei -20°C gelagert. Zur Kontrolle wurden 0,005ml Template-DNA in einer Agarosegelelekrophorese untersucht, wobei man noch vorhandene Doppelstrang-DNA erkennen kann.

Zur Markierung wurde analog der Sanger-Sequenzierung an der einsträngigen Template-DNA ein zweiter Strang synthetisiert, wobei radioaktives alpha-^{32}P-dATP verwendet wurde.

Zunächst wurde ein einsträngiges DNA-Fragment als Primer an die Template-DNA anhybridisiert ("Annealing"). Zu 0,008ml Template-Lösung wurden 0,002ml M13-Pentadecamerprimer (1µg/ml in Wasser) (New England Biolabs, Bad Schwalbach) und 0,001ml 0,1M Tris/HCl pH 7,5, 0,1M Magnesiumchlorid gegeben, in einem Eppendorfcup gemischt und 5min im Wasserbad bei 70°C inkubiert. Dann wurde langsam im Wasserbad abgekühlt.

0,004ml dieser "geprimten" DNA wurden mit 0,004ml Nukleotidmix (0,1mM dCTP, 0,1mM dGTP und 0,1mM dTTP in 10mM Tris/HCl pH 8,0) versetzt und die Reaktion durch Zugabe von 0,004ml Go-Mix, bestehend aus 0,002ml alpha-^{32}P-dATP(0,02mCi), 0,001ml Kleenowfragment (DNA-Polymerase I) und 0,005ml Wasser, gestartet. Nach 20min bei Raumtemperatur wurden 0,004ml Chase-Lösung (0,25mM dATP, 0,25mM dCTP, 0,25mM dGTP und 0,25mM dTTP) zugegeben. Nach weiteren 15min bei Raumtemperatur war die Reaktion abgeschlossen und das markierte Stück wurde direkt zur Hybridisierung eingesetzt.

2.11.4. Hybridisierung von Nitrocellulosefiltern mit markierter DNA nach Southern (1975)

Bei dieser Methode bindet markierte einsträngige DNA aus der Lösung durch Basenpaarung mit der einsträngigen auf dem Nitrocellulosefilter fixierten DNA. Durch Variation der Temperatur und des Puffers kann die Selektivität gesteuert werden. Da eine möglichst spezifische Bindung erwünscht war, wurden die Bedingungen hier sehr "stringent" gewählt.

Um unspezifische Bindungen abzusättigen wurde der Nitrocellulosefilter zunächst mit 6ml Prähybridisierungsmix 1-2h bei 65°C inkubiert. Zur Herstellung des Prähybridisierungsmix wurden 0,6ml 10% Sarkosyl, 0,6ml Herings-DNA (1mg/ml) und 3ml Wasser 5-10min in kochendem Wasser denaturiert, 5min in Eis/Wasser abgekühlt und mit 1,8ml 20xSCP (30mM Dinatriumhydrogenphosphat, 100mM Natriumchlorid und 0,5mM EDTA, pH 6,2 mit HCl) versetzt. Nachdem die Prähybridisierung beendet war, wurde das Prähybridisierungsmix abpipettiert und der feuchte Nitrocellulosefilter mit dem Hybridisierungsmix versetzt. Das Hybridisierungsmix wurde auf die gleiche Weise wie das Prähybridisierungsmix hergestellt, nur wurde statt eines Teils des Wassers die markierte DNA eingesetzt. Die Hybridisierung dauerte 12-16h bei 65°C.

Der Filter wurde nun zweimal 15min mit 2xSCP + 10% SDS, zweimal 15min mit 2xSCP und einmal 60min mit 0,4xSCP bei 45°C gewaschen. Anschließend wurde er getrocknet und zur Autoradiographie mit einem Kodak X-Omat S Film exponiert. Wenn nötig wurden Cromex Lightning-Plus Folien (Dupont, Stuttgart) zur Verstärkung auf den Film aufgelegt und der Film bei -70°C exponiert.

3. Ergebnisse

3.1. Suche eines Selektionssystems für Mutanten mit ausgefallener Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung

Zur Mutantengewinnung wurde zunächst versucht, ein geeignetes Selektionssystem zu entwickeln, das zumindest zu einer Anreicherung der gewünschten Mutanten führt.

Mutanten, die nicht inaktivieren, sollten bei erneutem Wechsel auf Medium mit dereprimierenden Bedingungen einen Wachstumsvorteil zeigen. Aufgrund der Mutation besitzen diese Mutanten sofort alle glycolytischen Enzyme, während eine Wildtypzelle 3-6 Stunden zur Derepression dieser Enzyme benötigt.

Daher wurden die Generationszeiten bestimmt, die für YEP-Glucose bei 2,2h, für YEP-Glycerin/Ethanol bei 4-4,5h und für YEP-Ethanol bei 4,5-5h lagen. Eine Kultur catl.S3-14A wurde in YEP-Glycerin/Ethanol angezogen, abzentrifugiert und in verschiedenen Medien, auf denen die Zellen nicht wachsen können, aufgenommen (synthetisches Medium minus Histidin, synthetisches Minimalmedium und KPP). Dann wurde sie halbiert, eine Hälfte wurde durch Zugabe von Glucoselösung inaktiviert, die andere diente durch Zugabe von Wasser zur Simulierung von Mutanten mit ausgefallener Inaktivierung. Nach 1,5 h Inaktivierung wurde das Medium erneut gewechselt, so daß wieder dereprimierende Bedingungen entstanden. Neben dem Zelltiter wurde in Proben die Enzymaktivität der FBPase bestimmt. Dabei zeigte sich erwartungsgemäß, daß die Hefezellen durch Glucose inaktiviert wurden und anschließend 3-6h zur Derepression benötigten. Die Zellen, die nicht inaktiviert wurden, zeigten gleichbleibend hohe FBPase-Aktivität. In beiden Fällen konnte nur ein sehr geringes Wachstum festgestellt werden (siehe Abb.2).

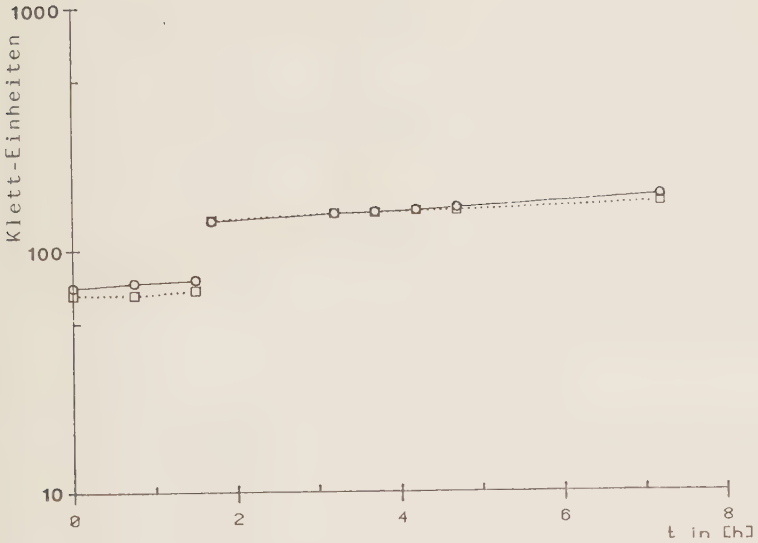


Abb.2: Wachstumskurve von catl.S3-14A gemessen durch Trübung am Klett - Photometer, durchgezogene Linie: plus Glucose, gepunktete Linie: minus Glucose

Nur Zellen, die die Enzyme inaktiviert haben, müssen diese neu synthetisieren. Deshalb sollten solche Zellen durch Gabe von Aminosäure-Analoga während der Derepressionsphase stärker geschädigt werden, als Zellen, die nicht inaktiviert haben. Um die Wirkung der Analoga auf das Zellwachstum zu testen, wurden die Zellen auf Platten, die synthetisches Glucose-Medium + Fluor-Phenylalanin, + Ethionin und + Fluor-Phenylalanin + Ethionin enthielten, ausplattiert. Eine schwache Absterberate wurde bei synthetischem Glucose-Medium + Fluor-Phenylalanin gefunden, auf synthetischem Glucose-Medium + Ethionin wuchs bei 100 und 10000 Zellen pro Platte keine Kolonie, bei 1 Millionen ausplattierter Zellen sah man einzelne Kolonien.

Eine Kultur catl.S3-14A wurde in YEP-Ethanol, eine weitere in YEP-Glucose angezogen, 5 Stunden dereprimiert und halbiert. Eine Hälfte wurde inaktiviert, die andere diente der Simulierung von nicht inaktivierbaren Mutanten. Nach 2 Stunden Inaktivierung wurde erneut halbiert, wobei eine Hälfte zur Kontrolle in synthetischem Derepressionsmedium mit allen Aminosäuren, die andere Hälfte in synthetischem Derepressionsmedium, bei dem Arginin durch Canavanin, Tyrosin durch Fluor-Phenylalanin und Methionin durch Ethionin ersetzt waren, suspendiert wurde. Nach 5 Stunden Derepression wurde die Zellzahl bestimmt und 10^2, 10^4, 10^6 Zellen/Platte ausplattiert. Nach 3,5 Tagen bei 30°C waren Kolonien gewachsen. Während des ganzen Versuches wurden laufend Proben zur Enzymbestimmung entnommen.

Wie Abb.3 zeigt, stiegen die Enzymaktivitäten der MDH und der FBPase bei der Gabe von Analoga nicht an. Trotzdem war nach 5 Stunden Derepression in Derepressionsmedium mit Analoga bei anschließendem Plattieren auf YEP-Glycerin/Ethanol nur eine geringe Schädigung der Zellen zu erkennen (Tab.1).

In einem entsprechenden Experiment wurden die Zellen 16 Stunden dem Derepressionsmedium mit Analoga ausgesetzt und erst dann auf YEP-Glycerin/Ethanol ausplattiert. Auch hier konnte kein Unterschied der Überlebensrate der mit Analoga behandelten Zellen zu unbehandelten festgestellt werden.

Tab. 1: Anzahl der überlebenden Zellkolonien (Doppelbestimmung) nach Glucose - Inaktivierung und Derepression mit bzw. ohne Aminosäureanaloga (Canavanin, Fluorphenylalanin und Ethionin)

	1. Versuch		2. Versuch	
inaktivierte Zellen				
mit Analoga	157	161	242	210
ohne Analoga	212	251	233	287
nicht inaktivierte Kontrollzellen				
mit Analoga	237	223	107	131
ohne Analoga	168	211	167	205

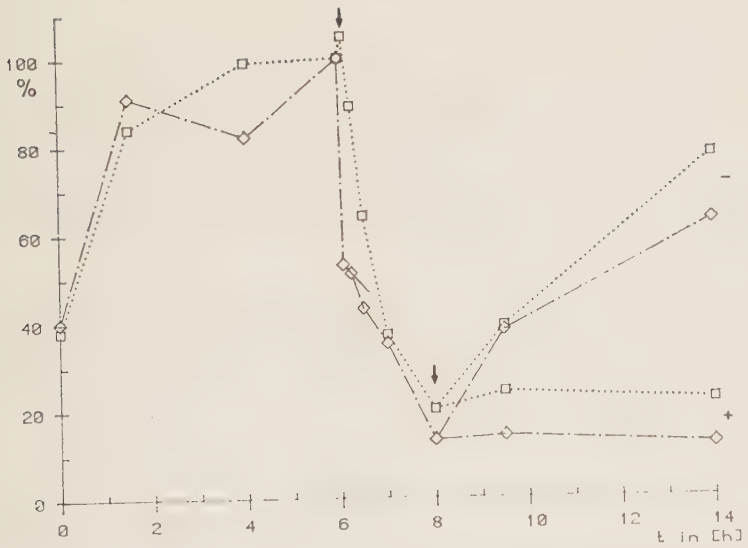


Abb. 3: Derepression, Inaktivierung und Derepression + bzw. - Aminosäureanaloga (Canavanin, Fluorphenylalanin, Ethionin)
MDH: 100% ≙ 1310mU/mg (gepunktet)
FBPase: 100% ≙ 46mU/mg (durchbrochen)

3.2. Ausarbeitung eines Screening-Systems

Nachdem es nicht möglich war, ein Selektions-System zu erhalten, wurde ein Detektions- oder Screening-System entwickelt. Screening bedeutet, daß mehr oder weniger wahllos so viele Zellen untersucht werden, daß aus rein statistischen Gründen die gesuchte Mutation dabei sein sollte. Aus der Anzahl der zu überprüfenden Zellen ergeben sich ganz andere Anforderungen an ein solches System, als es die Untersuchung einzelner Kulturen erfordert. Das System muß so gestaltet sein, daß möglichst viele Zellen gleichzeitig getestet werden können, und daß möglichst wenig einzelne Arbeitsgänge notwendig sind.

3.2.1. Vorversuche

Durch Mutation eines Wildtyp-Stammes mit Ethylmethylsulfonat (EMS) wurde die natürliche Mutationsrate erhöht. Der Stamm catl.S3-14A wurde so mutagenisiert, daß 50% der Zellen überlebten. Dabei sollte statistisch nur 1 Gen von der Mutation betroffen sein.

Um das Medium der Zellen zur Derepression nicht wechseln zu müssen, wurden die Zellen auf verschiedenen, dereprimierenden Vollmedien angezogen. Dabei wurde die Generationszeit und die FBPase- und MDH-Aktivität bestimmt.

Medium	Generationszeit (h)	Spezifische Aktivität	
		FBPase (mU/mg)	MDH (mU/mg)
YEP-Glycerin	4	27	947
YEP-Ethanol	4,5	26	1049
YEP-Lactat	ca 20	27	954
YEP-Acetat	11	16	935

Für das Screening-System wurde YEP-Ethanol gewählt.

Bei hohen Glucose-Konzentrationen im Medium weist die Zelle auch einen höheren Glucose 6-phosphat-Gehalt auf. Glucose 6-phosphat reagiert in dem FBPase-Test mit der Glucose 6-phosphat Dehydrogenase und führt so zu einem Anstieg des NADPH ("Blindlauf"). Deshalb sollte zur Inaktivierung möglichst wenig Glucose eingesetzt werden. Um die minimal notwendige Glucosekonzentration zu testen, wurde die FBPase-Aktivität nach 1h bzw. 2h Inaktivierung mit verschiedenen Glucosekonzentrationen bestimmt. Abb.4 zeigt, daß 0,4% D-Glucose zur vollständigen Inaktivierung ausreichen. Während des Screenings wurde also durch Zugabe von 5% D-Glucose-Lösung die Inaktivierung gestartet - das entspricht einer Endkonzentration von 0,45%.

Bei der erwarteten Zahl der zu untersuchenden Kolonien konnten die Zellen nicht durch Zentrifugation und zweimaliges Waschen

aufgearbeitet werden. Zur Lösung dieses Problems wurde die Tatsache ausgenutzt, daß sich Hefezellen bei Stehenlassen im Kühlraum nach 6-8h absetzen. Durch Vergleich der Zellernte durch Zentrifugation oder durch Sedimentation konnte gezeigt werden, daß bei 0°C die Inaktivierung gleichzeitig gestoppt wird. Nach der Sedimentation kann der Überstand abdekantiert, die Zellen durch Zugabe von 5ml KPP gewaschen und nach erneutem Absitzen geerntet werden.

Auch der Zellaufschluß mußte vereinfacht werden. Durch enzymatischen Verdau mit "Zymolyase" kann die Hefezellwand angedaut werden. Die gebildeten Sphäroplasten sind sehr empfindlich gegen osmotischen Druck oder chemische Reagenzien wie Toluol. Durch Behandlung mit 0,01 ml Toluol erhält man einen Rohextrakt, aus dem die Enzymaktivitäten bestimmt werden können.

Um die Wirksamkeit der Aufschlußmethode mit Zymolyase und Toluol zu testen, wurde nach verschiedenen Zeiten der Inkubation und mit verschiedenen Konzentrationen an Zymolyase die FBPase-Aktivität bestimmt. Eine Zellsuspension wurde in gleiche Proben aufgeteilt und abzentrifugiert. Zu den Zellen (ca. 0,1 g Naßgewicht) wurden 0,1ml bzw 0,05ml Zymolyase-Lösung (10mg Zymolyase 5000 in 1ml KPP pH7,5) gegeben. Nach verschiedenen Inkubationszeiten bei 30°C wurden die angedauten Zellen durch Zugabe von 0,01 ml Toluol lysiert. Nach Zugabe von 0,3ml KPP wurde aus diesem Rohextrakt die FBPase-Aktivität bestimmt. Aus Abb.5 erkennt man, daß nach 8 Stunden etwa die gleiche FBPase-Aktivität sowohl mit 1mg Zymolyase/0,1g Zellen als auch mit 0,5mg Zymolyase/0,1g Zellen erreicht ist. Daher wurde für das Screening-System eine Inkubationsdauer von 8h bei 30°C mit 0,5mg Zymolyase/0,1g Zellen gewählt.

Um ein schnelles Erkennen des Inaktivierungsverhaltens zu ermöglichen, sollte ein Testenzym gewählt werden, das mit einem direkt sichtbaren Aktivitätstest gekoppelt werden kann. Die FBPase war gut geeignet, da sie nur ein Isoenzym besitzt, das

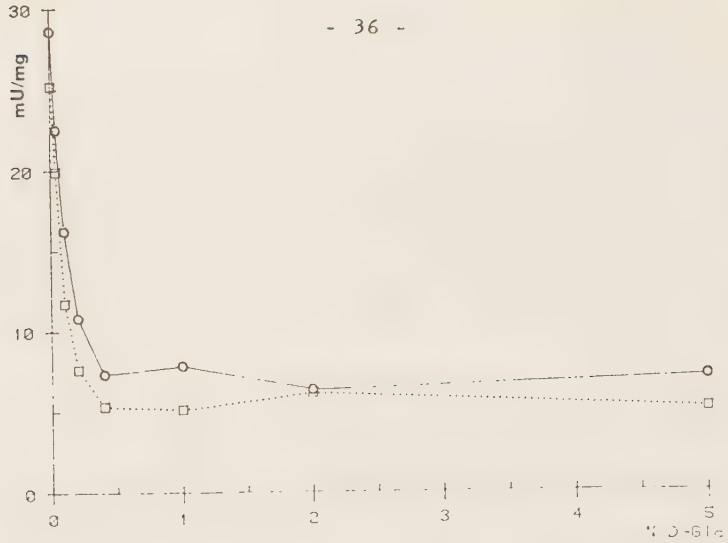


Abb.4: FBPase-Inaktivierung in Abhängigkeit von der Glucose-Konzentration im Medium,
durchgezogen: 1h, gepunktet: 2h nach Glucose-Zugabe

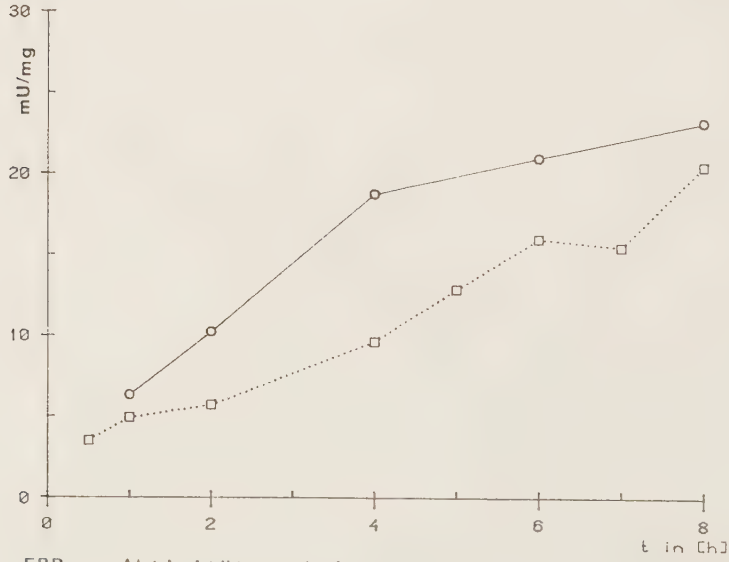


Abb.5: FBPase-Aktivität nach Aufschluß der Zellen mit Zymolyase/Toluol in Abhängigkeit von der Zeit,
durchgezogen: 1mg Zymolyase/0,1g Zellen
gepunktet: 0,5mg Zymolyase/0,1g Zellen

inaktiviert wird. Bei der MDH wird dagegen nur die cMDH (cytoplasmatische MDH) inaktiviert. Im Enzymtest aus dem Rohextrakt aber wird die Aktivität sowohl der inaktivierbaren cMDH als auch der nicht inaktivierbaren mMDH (mitochondriale MDH) zusammen bestimmt.

Die Bestimmung der FBPase-Aktivität über den Nachweis des abgespaltenen Phosphats gelang nicht, da bei den hier zu testenden Rohextrakten der Phosphat-Gehalt schon vor Start der Reaktion sehr hoch war. Deshalb konnte optisch nur schwer zwischen inaktivierter und nicht inaktivierter Probe unterschieden werden.

Das bei der FBPase-Reaktion entstandene Fructose 6-phosphat kann im gekoppelten Test zu Glucose 6-phosphat isomerisiert und mit der Glucose 6-phosphat Dehydrogenase oxidiert werden, so daß NADPH entsteht (siehe 2.8.2.). NADPH reduziert mit Hilfe von Phenazinmethosulfat das Tetrazoliumsalz MTT zu einem blauen Farbstoff, der leicht optisch erkennbar ist. (Thorne et al. 1963). Da die MTT-Lösung lichtempfindlich ist, wird sie erst am Ende der Reaktion zugegeben. Die NADPH-Eichkurve mit MTT ist bis zu einer OD von 2,0 linear (Abb. 6).

Zusammenfassend ergab sich zur Bestimmung des Inaktivierungsverhaltens folgendes Verfahren. 0,3ml Rohextrakt wurden mit 0,7ml Reaktionsgemisch, das 0,5mM $NADP^+$, 0,1mM EDTA, 10mM $MgCl_2$, 100mM KCl und 1mM FDP enthält , gestartet. Nach 30-60 min bei 30°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 0,5ml frisch hergestellter MTT-Lösung gestoppt, die 10mg MTT und 1,75mg Phenazinmethosulfat in 50ml 0,5M KPP enthielt (Produkthemmung der FBPase durch hohe Phosphat-Konzentrationen). Nach 1-2 min war die Farbentwicklung abgeschlossen, die ca. 10min stabil blieb. Die Farbintensität wurde meist optisch, konnte aber auch bei 578nm photometrisch bestimmt werden. Eine inaktivierte Probe hat nur sehr wenig FBPase-Aktivität und bleibt deshalb gelb bis hellblau gefärbt. Die nicht inaktivierte Kontrollprobe färbt sich dunkelblau.

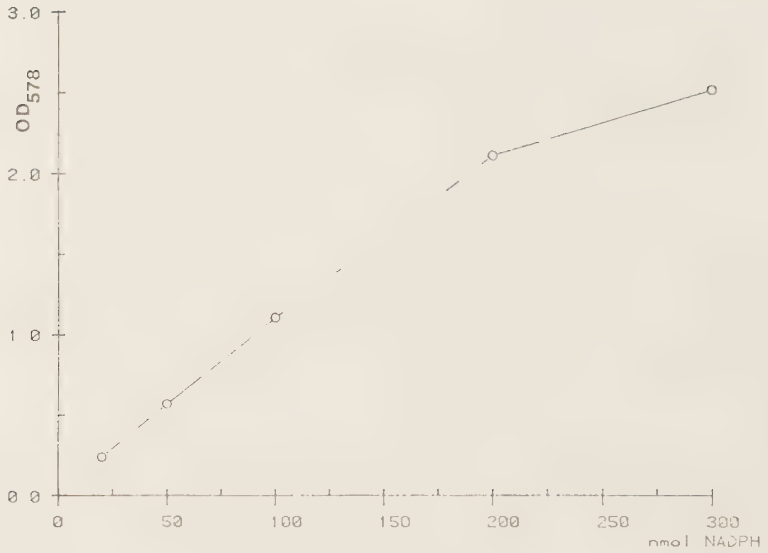


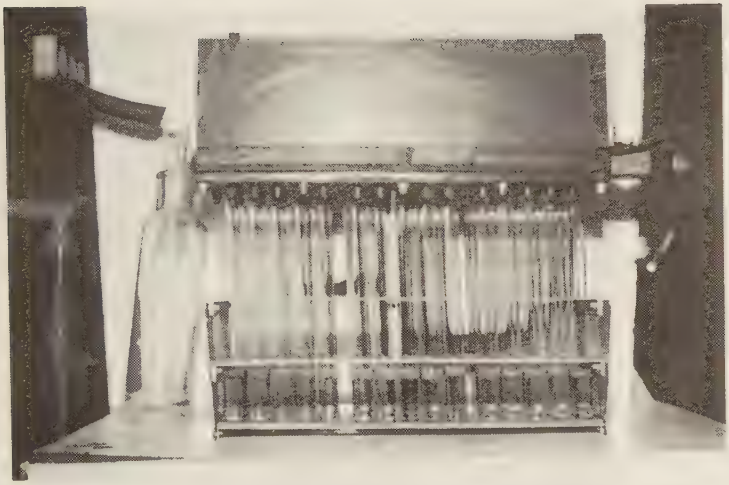
Abb.6: Eichgerade für die Reduktion von MTT mit NADPH

Um diese und die anderen Pipettierschritte in großem Maßstab durchführen zu können, wurde von der Institutswerkstatt eine spezielle Apparatur gebaut, die es ermöglicht gleichzeitig 45 Proben zu pipettieren (Abb.7).

Da alle Zellen zur Bestimmung der Inaktivierbarkeit aufgeschlossen werden, mußte dafür gesorgt werden, daß vorher eine "Masterplate" angefertigt wurde, von der interessierende Kolonien für weitere Untersuchungen abgeimpft werden können. Dies geschieht ebenfalls mit einer speziellen Apparatur, wobei 45 Stahlstäbe, die mit Ethanol sterilisiert werden können, in die Zellsuspension eintauchen. Der anhaftende Flüssigkeitsfilm reicht aus, um durch Einstechen in quadratische Agarplatten Kolonien wachsen zu lassen.

Als dritte Hilfe diente eine Abfüllanlage, die gleichzeitig 45 Gläschen mit 5ml Flüssigkeit füllt.

a)



b)

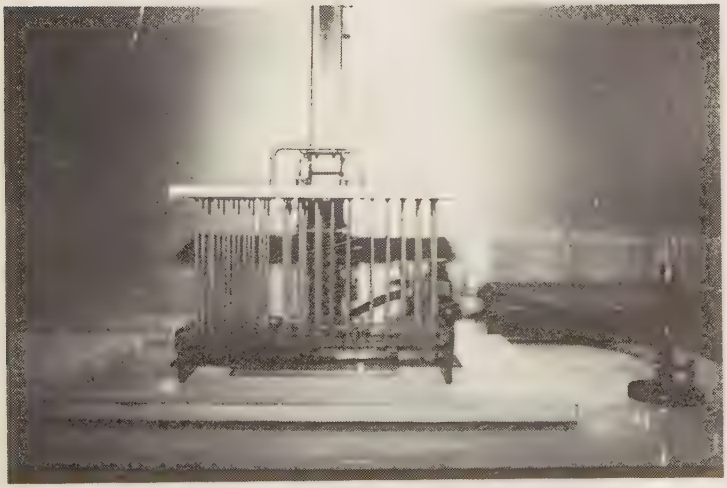
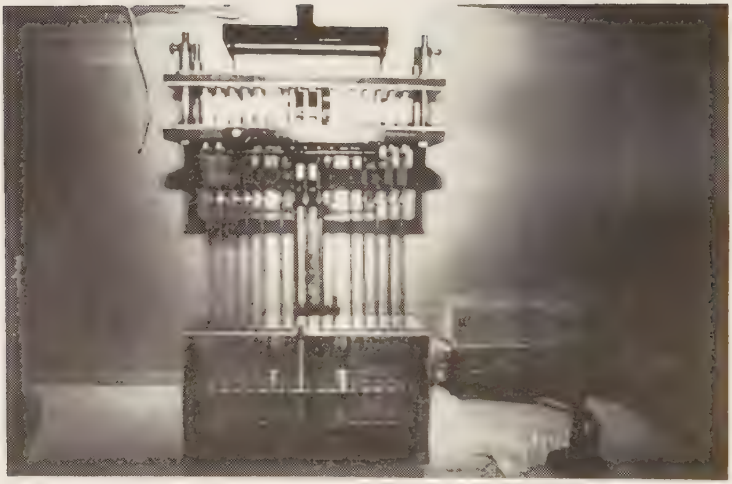


Abb. 7 : a) Abfüllanlage b) Stempelapparatur

c)



d)

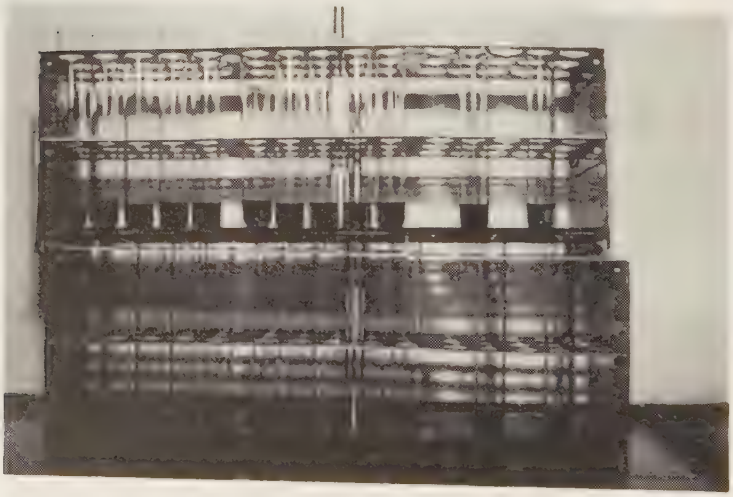


Abb. 7 : c) Pipettierapparatur d) inaktivierte Proben

3.2.2. Screening-System

Aus diesen Vorversuchen wurde folgendes Verfahren entwickelt. Um möglichst viele Proben zu testen und unnötige Leerzeiten zu vermeiden, wurden in einer Woche 2 Versuchsreihen versetzt durchgeführt. Am 3. Tag des 1. Versuches wurde die 2. Versuchsreihe gestartet. Nach dem Waschen blieben die Kulturen über das Wochenende im Kühlraum stehen. In KPP können die Zellen nicht wachsen, und so war keine Veränderung zu erwarten. Nach 2 weiteren Tagen wurde diese Versuchsreihe abgeschlossen.

Am 1. Tag wurden Einzelkolonien mutagenisierter Zellen mit Plastikimpfösen, die mit Ethanol sterilisiert wurden, in 5ml YEP-Ethanol angeimpft, jeweils 45 Proben/Ständer und 8-10 Ständer pro Versuch. Dann wurden sie bei 30°C im Brutraum geschüttelt.

Am 2. Tag waren die Zellen soweit gewachsen, daß sie in der "Laminar-Flow-Box" nach Wachstum sortiert wurden. Mit Hilfe des Klett Summerson Photometers kann die Trübung direkt im Glas gemessen werden. Wenn die Zellen 190-250 Klett-Einheiten erreicht hatten - dies entspricht der mittel- bis spätlogaritmischen Wachstumsphase - wurden sie inaktiviert. Die anderen Zellen wurden weiterinkubiert, bis sie entsprechende Werte erreichten, so daß zu 2-4 verschiedenen Zeitpunkten Inaktivierungen durchgeführt wurden.

Zunächst wurde die "Masterplate" angefertigt; dann wurde die Zellsuspension mit der Pipettierapparatur halbiert. Die eine Hälfte wurde zur Kontrolle direkt in den Kühlraum gestellt, die andere Hälfte wurde durch Zugabe von 0,250ml 5% D-Glucose - das entspricht einer Endkonzentration von 0,45% D-Glucose - inaktiviert. Nachdem die Zellen 1h im Brutraum bei 30°C geschüttelt hatten, wurden sie auch in den Kühlraum zum Absitzen gestellt.

Am 3. Tag wurde das klare überstehende Medium dekantiert und mit Hilfe der Abfüllanlage wurden die Zellen durch Zugabe von 5ml sterilem KPP 1x gewaschen. Anschließend wurde im Kühlraum absitzen gelassen.

Nach spätestens 8 Stunden zeigten sich klare Überstände. Da aber keine Veränderung der Aktivität auch über einen längeren Zeitraum im Kühlraum festgestellt wurde, wurden nun die zu verschiedenen Zeitpunkten inaktivierten Zellproben wieder synchronisiert. War der Überstand nicht klar, war die Kultur mit Bakterien infiziert. Diese Kulturen wurden sofort aussortiert. Üblicherweise waren 0-10 Kulturen aus 360 angeimpften Kulturen infiziert.

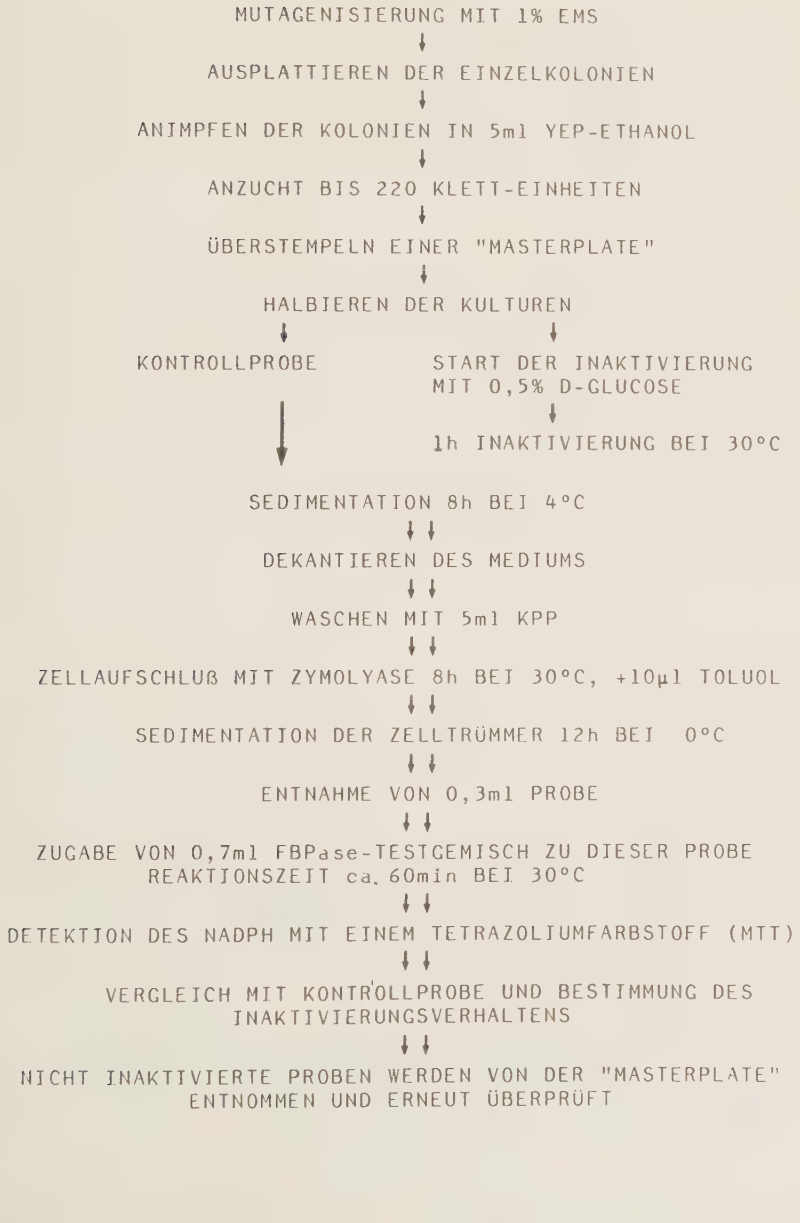
Am 4. Tag wurde der KPP abdekantiert. Zum Aufschluß wurde 0,050ml Zymolyase-Lösung (10mg Zymolyase5000 oder 2,5mg Zymolyase20000/ml in KPP pH7,5) mit der "Multipette" zum Zellsediment zugegeben. Der Verdau dauerte 8h bei 30°C im Brutraum unter gelegentlichem Schütteln der Ständer. Anschließend wurden die Sphäroplasten durch Zugabe von 0.010ml Toluol lysiert. Um den Rohextrakt zu erhalten wurden noch 0,300ml KPP zugegeben, geschüttelt und zum Absitzen der Zelltrümmer und Zellwände in den Kühlraum gestellt.

Am 5. Tag wurden mit der Pipettierapparatur 0.3ml klarer Rohextrakt abpipettiert und in frische Gläschen überführt. Dabei wurde genau darauf geachtet, daß keine Zelltrümmer mitpipettiert wurden, da diese sonst die Reaktion verfälschen.

Die Reaktion wurde durch Zugabe von 0,7ml Reaktionsgemisch (s.o.) gestartet. Meist wurde der NADPH-Anstieg einer Probe am Photometer verfolgt. Daraus wurde die Reaktionszeit der übrigen Proben bestimmt, die zwischen 30-60min lag. Durch Zugabe von 0,5ml MTT-Lösung (s.o.) wurde die Reaktion gestoppt und gleichzeitig detektiert. Optisch wurde die dunkelblau gefärbte nicht inaktivierte Kontrollprobe mit der gelb bis hellblau gefärbten inaktivierten Probe verglichen. War nur ein geringer oder kein Farbunterschied vorhanden, so zeigte dies, daß die Probe nicht inaktiviert hatte und diese Probe wurde aussortiert, d.h. sie wurde von der "Masterplate" auf eine YEP-Ethanol-Platte abgeimpft (Abb.7).

Zur Übersicht ist das Sreening-System noch einmal als Flußschema in der Abb.8 zu sehen.

Abb. 8: SCREENING-SYSTEM, FLUßSCHEMA



3.2.3. Kontrolle des Screening-Systems

Zur Überprüfung des Sreening-System wurde mit dem Wildtypstamm catl.S3-14A angeimpft. Ein Teil der Zellen wurde durch Zugabe von Wasser statt Glucose-Lösung nicht inaktiviert. Aus den Zahlen der Tabelle 2 erkennt man, daß bei den inaktivierten Proben die Extinktion vor Start der Reaktion (E_0-Wert) relativ groß ist. Trotzdem ist eine Unterscheidung möglich und das Screening somit durchführbar.

Bei geringerem Rohextrakteinsatz und dafür längerer Reaktionsdauer sinkt zwar der E_0-Wert, aber die Unterscheidung der Aktivitäten der inaktivierten und der nicht inaktivierten Proben wird schwerer (Extinktion am Ende der Reaktion $\hat{=}$ E-Wert). Deshalb ist es günstig möglichst aktive Proben einzusetzen, so daß die Reaktionszeit unter 1h bleibt.

Tab. 2: Aktivitätsbestimmung der FBPase über die Extinktion bei 578nm von cat 1.S3-14A, 0 h und 1 h nach Glucosegabe

	E_0	E	E
0 h	0,2	1,6	1,4
	0,3	1,2	0,8
	0,4	1,4	1,0
Mittel-werte	0.3	1.4	1.1
0 h + H_2O	0,2	1,1	0,9
	0,2	0,8	0,6
	0,2	1,4	1,2
	0.3	1.1	0.8
	0,3	1,1	0,8
Mittel-werte	0,2	1,1	0,9

	E_0	E	E
1 h	0,2	0,3	0,1
	0,4	0,5	0,1
	0,4	0,5	0,1
	0.5	0.6	0.1
	0.3	0.5	0.2
	0,4	0,5	0,1
	0,4	0.7	0.3
Mittel-werte	0.4	0.5	0.1

3.3 Durchführung des Screening zur Isolierung von Mutanten mit ausgefallener Kohlenstoff - Katabolit - Inaktivierung von S. cerevisiae

Der lange Zeitraum, der zur Untersuchung von einer solchen Anzahl von Kolonien benötigt wird, macht es erforderlich, mehrere Mutagenisierungen durchzuführen. Dabei wurden die Bedingungen der Mutagenese jeweils nach den Anforderungen der Versuche geändert.

1. Mutagenisierung
Die Zellen wurden mutagenisiert wie in 2.9.1. beschrieben. In 5ml YEP-Ethanol wurde der Stamm catl.S3-14A angezogen. Die Zellen wurden abzentrifugiert steril in 5ml KPP aufgenommen, mit 2% EMS mutagenisiert und 1h im Brutraum bei 30°C geschüttelt. Danach wurden die Zellen 2x mit sterilem KPP gewaschen und in 10ml frisches YEP-Ethanol Medium zur Ausprägung der Mutation gegeben. Nach 50h war die Zelldichte nur geringfügig stärker (von 220 auf 270 Klett-Einheiten). Die Zellzahl wurde bestimmt und ca. 650 Zellen/Platte auf YEP-Glycerin/Ethanol ausgestrichen. Nach 4-6 Tagen wuchsen ca. 150 Zellen pro Platte, das entspricht einer Überlebensrate von ca. 25%.

Diese Zellen wurden für die Mutantenscreening-Versuche 1-10 eingesetzt. Dabei wurden üblicherweise 10-20% der Proben pro Versuch als nicht inaktivierbar aussortiert. Diese Proben wurden von der "Masterplate" auf YEP-Glycerin/Ethanol Platten abgeimpft.

Wenn genügend solche Proben aussortiert waren, wurden die Zellen ein zweites Mal mit dem Screening-System untersucht. Dabei zeigten noch etwa 50-60% der Kolonien keine Inaktivierung. Die Zellen, die auch ein zweites Mal nicht inaktiviert hatten, wurden von 1 an durchnumeriert.

Aus den Mutantenscreening-Versuchen 1-10 wurden so die Zellkulturen Nr. 1-167 und 335-343 aussortiert.

2. Mutagenisierung
In 5ml YEP-Ethanol wurde catl.S3-14A angezogen. Die Zellen wurden steril abzentrifugiert, in 5ml KPP aufgenommen und zur Mutagenisierung mit 2% EMS 1h bei 30°C geschüttelt. Dann wurden sie 2x mit KPP gewaschen und zur Ausprägung in 5ml frisches YEP-Ethanol suspendiert. Nach 48h war die Zelldichte von 32 auf 53 Klett-Einheiten angestiegen. Die Zellzahl wurde bestimmt und 500 Zellen/Platte YEP-Glycerin/Ethanol ausgestrichen. Eine Mutationskontrolle wurde durchgeführt, ca. 30% der Zellen überlebten.

Mit diesen Zellen wurden die Mutantenscreening-Versuche 11-22 durchgeführt. Dabei wurden die Zellkulturen Nr. 168-334 und 345-508 aussortiert.

3. Mutagenisierung
catl.S3-14A wurde in 5ml YEP-Ethanol angezogen. Die Zellen wurden steril abzentrifugiert, in 5ml KPP aufgenommen und mit 1% EMS 45min mutagenisiert. Dann wurde die Suspension abzentrifugiert, 2x mit KPP gewaschen und in 10ml frischem YEP-Ethanol aufgenommen. Nach 70h bei 30°C war die Zelldichte von 75 auf 255 Klett-Einheiten angestiegen. Das entspricht zwar mehr als einer Verdopplung (ca. 1,5 Generationen), da aber nur ein kleiner Teil der gesamten Zellen untersucht wird, sollte das nicht stören. Die Zellzahl wurde bestimmt und 300 Zellen /Platte YEP-Glycerin/ Ethanol ausgestrichen. Die Kontrolle der Mutationsrate ergab 50% überlebende Zellen - 0-Wert: 275 wachsende Kolonien, nach 45min: 140 Kolonien.

Mit diesen Zellen wurden die Mutantenscreening-Versuche 23-33 durchgeführt. Die Zellkulturen Nr.509-673 wurden aussortiert.

4. Mutagenisierung
Da eine Reversion des Aminosäurebedürfnisses des Ausgangsstamms catl.S3-14A festgestellt wurde, wurde nun der Wildtypstamm H38-4B gewählt, der 2 Aminosäurebedürfnisse hat.

H38-4B wurde in 5ml YEP-Ethanol angezogen. Die Zellen wurden steril abzentrifugiert, in 5ml KPP aufgenommen und mit 2% EMS 20min bei 30°C mutagenisiert. Dann wurde die Zellsuspension abzentrifugiert, 2x mit sterilem KPP gewaschen und in 10ml frischem YEP-Ethanol aufgenommen. Nach 52h bei 30°C war die Zelldichte von 70 auf 92 Klett-Einheiten angestiegen, die Zellzahl wurde bestimmt und 300 Zellen/Platte YEP-Glycerin/Ethanol ausgestrichen. Die Kontrolle der Mutationsrate ergab beim 0-Wert 273 Kolonien, beim 20min-Wert 108 Kolonien, das entspricht einer Überlebensrate von 40%.

Mit diesen Zellen wurden die Mutantenscreening-Versuche 34-58 durchgeführt. Die Zellkulturen Nr.674-972 wurden aussortiert.

Aus diesen 4 Mutagenisierungen wurden ca. 11000 Kolonien von catl.S3-14A und ca. 8500 Kolonien von H38-4B mit einer Mutationsrate von 30-50% überlebende Zellen untersucht, wobei 970 Kolonien als nicht inaktiviert aussortiert wurden.

5. Mutagenisierung

Da eventuell nur eine Doppelmutation zu einem Ausfall der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung führt, sollte bei dieser Mutagenisierung die Mutationsrate erhöht werden.

Der Stamm H38-4B wurde in 5ml YEP-Ethanol angezogen. Die Zellsuspension wurde steril abzentrifugiert,in 5ml KPP aufgenommen und mit 2% EMS 30min bei 30°C mutagenisiert. Die Zellsuspension wurde abzentrifugiert, 2x mit KPP gewaschen und in 5ml frischem YEP-Ethanol aufgenommen. Nach 35h bei 30°C konnte keine Zunahme der Zelldichte festgestellt werden, da bei nur 1-5% überlebenden Zellen die Dichtezunahme der Zellsuspension zu gering ist. Die Zellzahl wurde bestimmt und 2000 Zellen/Platte ausgestrichen. Davon wuchsen 300-350 Kolonien. Die Kontrolle der Mutationsrate ergab 130 Kolonien beim 0-Wert und 6.6 Kolonien nach 30min. Dies entspricht 5% überlebenden Zellen.

Mit diesen Zellen wurden die Mutantenscreening-Versuche 59-72 durchgeführt. Die Zellen Nr.1000-1168 wurden aussortiert.

Die vorselektionierten Kolonien wurden in YEP-Ethanol angezogen, eine "Masterplate" angefertigt, die Suspension halbiert und eine Hälfte 1h inaktiviert. Diesmal wurde die Zellsuspension dann bei 5000Upm abzentrifugiert, 2x mit KPP gewaschen und anschließend eingefroren. Nach Aufschluß mit Glasperlen wurde die Proteinkonzentration und die FBPase-Aktivität bestimmt, so daß nun die spezifischen Aktivitäten verglichen werden konnten. Nur wenn die spezifische Aktivität gleich blieb, gilt dies als eindeutiger Hinweis, daß die Katabolit-Inaktivierung ausgefallen ist.

Alle vorselektionierten Kolonien zeigten dabei eine Inaktivierung der FBPase entsprechend dem Wildtyp.

Allerdings konnte eine Kolonie isoliert werden, die nicht inaktivierte. Bei diese Zellen handelt es sich um eine Infektion mit einer Hefe der Gattung Cryptococcus albidus, die die FBPase, die MDH und die PEP-CK weder reprimieren noch inaktivieren kann (Tab.3).

Tab.3: Derepression und Inaktivierung von MDH, FBPase und PEP-CK in Cryptococcus albidus

Zeit in min	spezifische Aktivität in mU/mg			
	MDH	FBPase	PEP-CK	
0	2830	54,6	19,0	
90	2862	55,8		Derepression durch
150	3107	52,5		Umsetzen auf Acetat-
210	2450	56,3		Medium
300	2591	58,7	19,6	
0	2591	58,7	19,6	
5	3026	56,3	21,0	Inaktivierung durch
10	3017	55,3	20,2	Zugabe von 2% Glucose
30	2445	57,5	21,1	
60	2476	53,0	21,0	
90	3275	63,3	19,5	
120	2458	59,9	18,1	

Die Isolierung dieser Infektion ist ein Beweis, daß es das Screening-System ermöglicht, Zellen mit ausgefallener Katabolit-Inaktivierung zu erkennen. Aus statistischen Überlegungen müßte man andererseits annehmen, daß bei der Untersuchung von 25000 Kolonien von Saccharomyces cerevisiae eine Mutante mit ausgefallener Katabolit-Inaktivierung, wenn es sie gibt, gefunden worden wäre. Es ist möglich, daß eine solche Mutation letal ist. Das könnte aber aus den bisherigen Untersuchungen zum Mechanismus nur erklärt werden, wenn dadurch mehr als die Regulation der glucogenetischen Enzyme betroffen wird (siehe z.B. die Wachstumsversuche mit Aminosäureanaloga).

3.4. Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung bei verschiedenen Hefen

Eine Erklärung, warum keine Mutante mit ausgefallener Katabolit-Inaktivierung gefunden wurde, kann in dem komplexen Mechanismus der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung liegen. Deshalb wurde nun die Inaktivierung bei verschiedenen Hefe-Species untersucht.

Der Stamm CBS 683 (Kluyveromyces lactis), der Stamm NCYC 737 (Candida utilis), sowie eine selbst isolierte Hefe LD, die später als Candida parapsilosis bestimmt wurde, wurden in 100ml YEP-Glucose angezogen und 5-6h in synthetischem Acetat-Medium dereprimiert. Durch Zugabe von 10ml 20% D-Glucose wurde die Inaktivierung gestartet. Die Proben à 5ml wurden zu den entsprechenden Zeiten entnommen, zweimal gewaschen und anschließend tiefgefroren.

Die Aktivitätsbestimmung zeigte für Candida utilis auch nach 8h Derepression nur eine sehr geringe FBPase-Aktivität, während die spezifische Aktivität der MDH vergleichbar mit Saccharomyces cerevisiae war. Die Inaktivierungskinetik der FBPase, der MDH und der PEP-CK ist für alle vier Hefen in Abb.9 dargestellt.

Es fällt auf, daß die Stämme von Kluyveromyces lactis, Candida utilis und Candida parapsilosis keine schnelle Inaktivierung der FBPase zeigen. Erst nach einer Zeitspanne von 10-30min setzt die

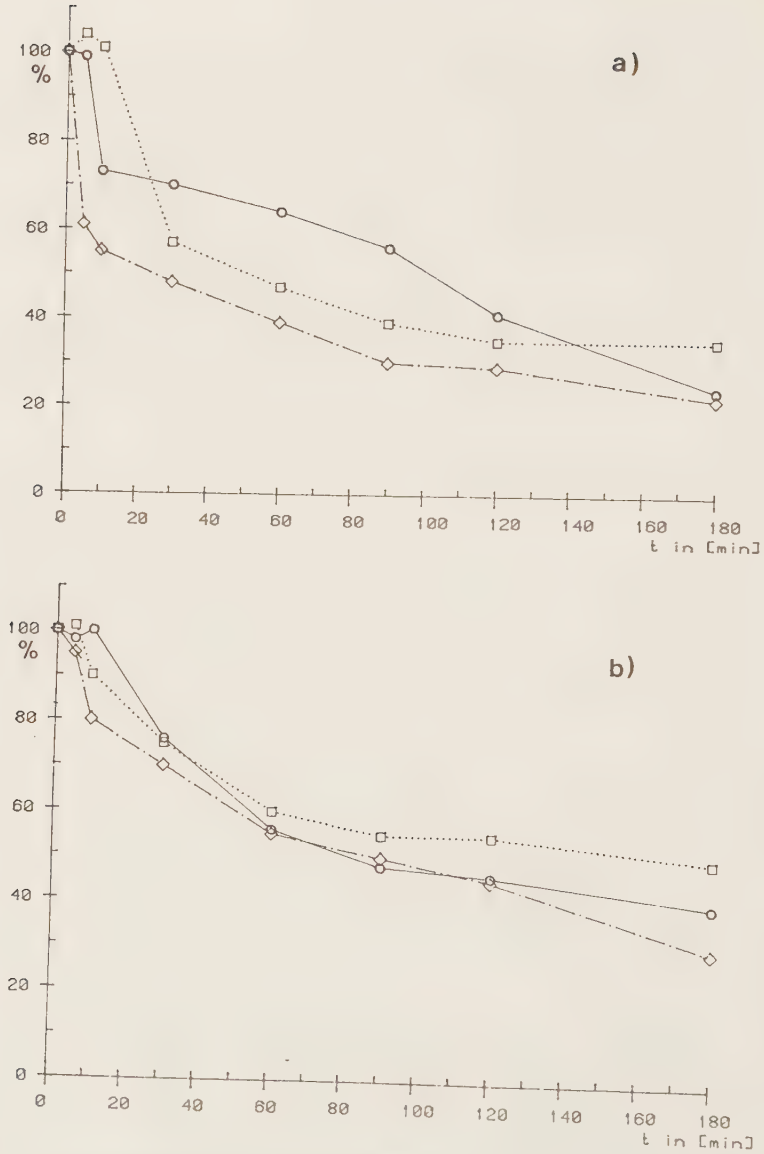
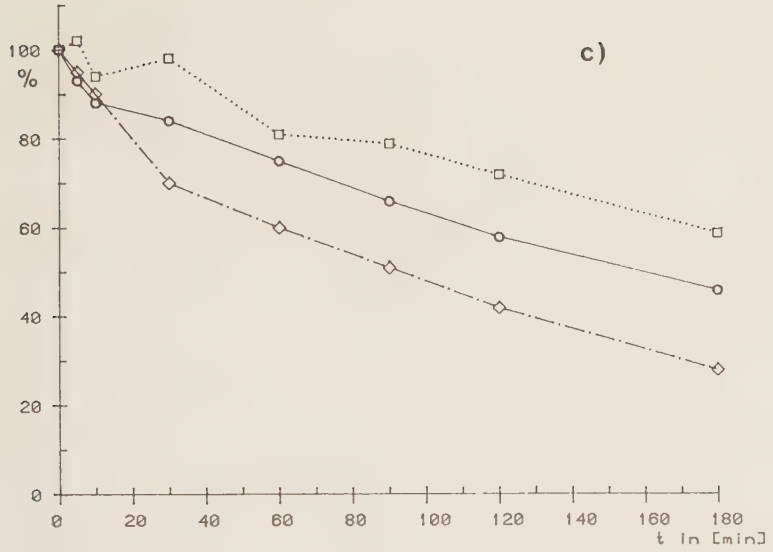
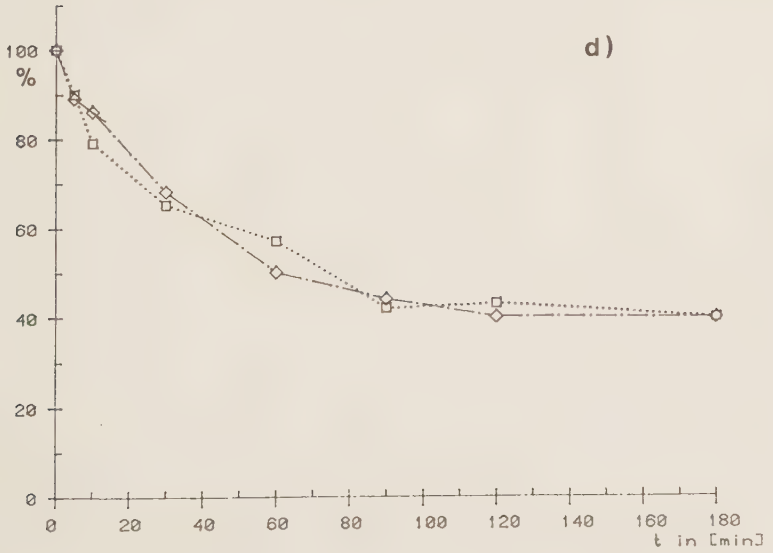


Abb. 9: Inaktivierung von Hefen durch Zugabe von Glucose der MDH (gepunktet), FBPase (durchbrochen) und PEP-CK (durchgezogen):

a) catl.S3-14A: MDH 100% ≙ 1600-2400mU/mg, FBPase 100% ≙ 20-36mU/mg, PEP-CK 100% ≙ 200-300mU/mg

b) LD : MDH 100% ≙ 1600-2800mU/mg, FBPase 100% ≙ 20-35mU/mg, PEP-CK 100% ≙ 50- 70mU/mg





c) CBS683 : MDH 100% ≙ 660- 760mU/mg, FBPase 100% ≙ 20-23mU/mg, PEP-CK 100% ≙ 80-110mU/mg

d) NCYC737 : MDH 100% ≙ 1150-1400mU/mg, FBPase 100% ≙ 8mU/mg

Inaktivierung der FBPase, ähnlich der Inaktivierung der MDH ein. Insgesamt scheint die Inaktivierung etwas schwächer ausgeprägt zu sein als bei Saccharomyces cerevisiae.

Um die Inaktivierung eindeutig von der Repression zu unterscheiden, wurde nun eine Inaktivierung unter Zusatz von Cycloheximid durchgeführt. Außer der Proteinsynthese hemmt Cycloheximid unspezifisch die Inaktivierung der MDH (Ferguson et al., 1967), die FBPase- und PEP-CK-Inaktivierung verlaufen aber normal.

Tab.4: Glucose - Inaktivierung der MDH und FBPase bei Zusatz von 1000ppm Cycloheximid bei verschiedenen Hefen

MDH:

	catl.S3-14A	CBS683	CBS604	LD	LDccil	LDcci2
	Anfangsaktivität (mU/mg) ≙ 100%					
	990	870	2050	1900	2090	2130
Zeit	Restaktivität in %					
0min	100	100	100	100	100	100
5min	101	100	101	110	108	94
30min	102	100	99	106	90	93
60min	103	93	101	100	89	92
90min	100	92	97	99	84	86
120min	105	97	100	104	84	81

FBPase:

	catl.S3-14A	CBS683	CBS604	LD	LDccil	LDcci2
	Anfangsaktivität (mU/mg) ≙ 100%					
	20	16,5	24	22	20	24
Zeit	Restaktivität in %					
0min	100	100	100	100	100	100
5min	56	96	96	107	107	104
30min	59	92	71	61	110	113
60min	51	108	57	54	88	94
90min	47	101	54	49	87	90
120min	35	112	59	55	101	105

10min vor Start der Inaktivierung wurden 1000ppm Cycloheximid, in 1ml Ethanol gelöst, zugegeben. Gestartet wurden mit 10ml 20% D-Glucose-Lösung, Proben à 5ml wurden zu den entsprechenden Zeiten entnommen. Das Inaktivierungsverhalten von CBS 683 (K. lactis) und LD (C. parapsilosis) sind in Tab.4 dargestellt.

Der Stamm LD zeigt 60min nach Glucose-Zugabe eine Abnahme der FBPase-Aktivität auf 55%, auch wenn durch Cycloheximid die Proteinsynthese gehemmt wird (Abb.10). Die Abnahme der spezifischen Aktivität kann also nicht durch die Synthese von anderen Proteinen bei gleichzeitiger Glucose-Repression verursacht sein.

Der Stamm CBS 683 inaktiviert in Anwesenheit von 100ppm Cycloheximid die FBPase und die PEP-CK, bei 1000ppm Cycloheximid aber weder die MDH noch die FBPase oder die PEP-CK (Abb.11).Ob dies

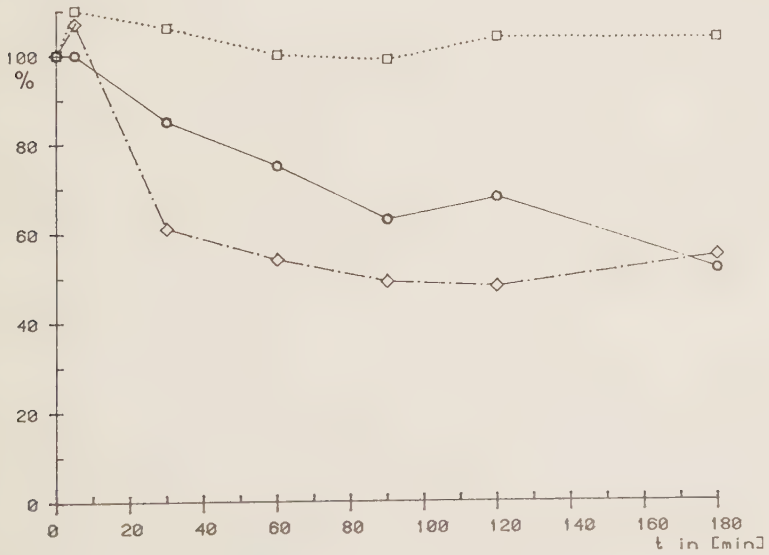


Abb.10:
Glucose-Inaktivierung von LD unter Zusatz von 1000ppm Cycloheximid
MDH: 100% ≙ 1900mU/mg (gepunktet)
FBPase : 100% ≙ 22mU/mg (durchbrochen)
PEP-CK : 100% ≙ 45mU/mg (durchgezogen)

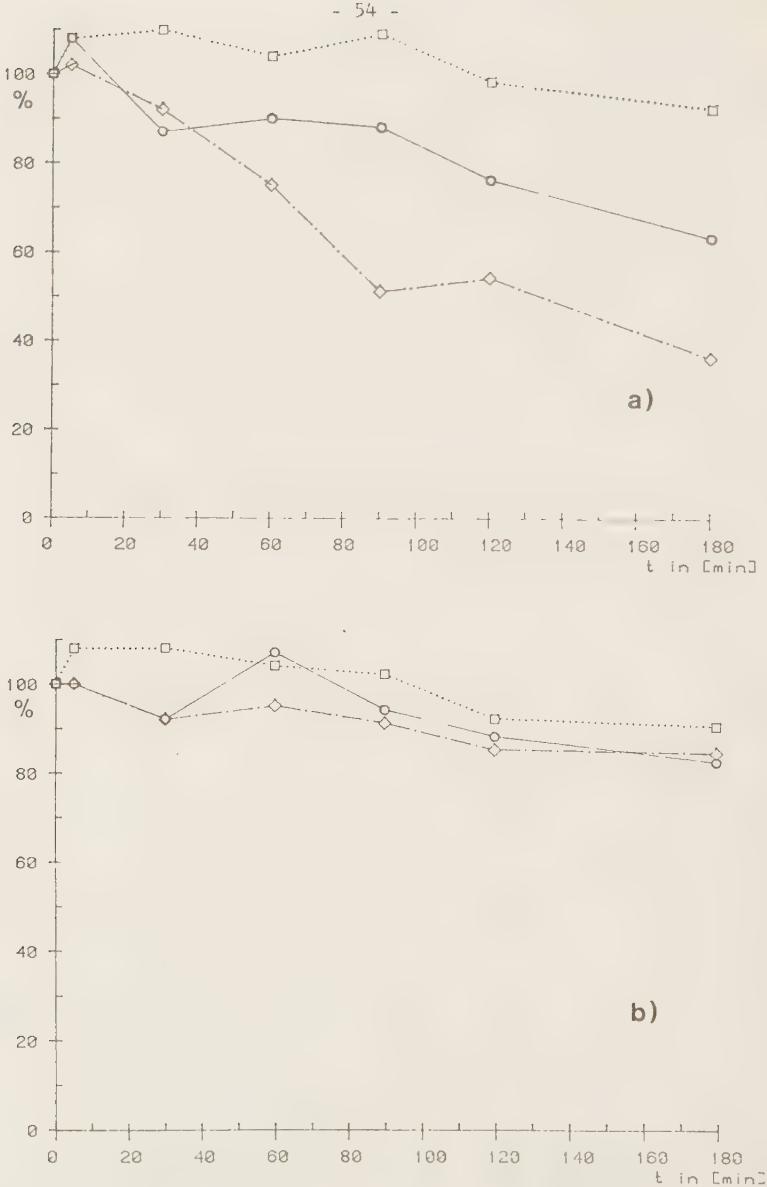


Abb. 11: Glucose-Inaktivierung in CBS683 von MDH (gepunktet), FBPase (durchbrochen) und PEP-CK (durchgezogen) unter Zusatz von

a) 100 ppm Cycloheximid: MDH 100% ≙ 400mU/mg, FBPase 100% ≙ 22mU/mg PEP-CK 100% ≙ 91mU/mg

b) 1000ppm Cycloheximid: MDH 100% ≙ 800mU/mg, FBPase 100% ≙ 18mU/mg PEP-CK 100% ≙ 83 mU/mg

auf einen unspezifischen Effekt des Cycloheximids wie bei der MDH-Inaktivierung zurückgeht, ist noch nicht geklärt. Bei 100ppm Cycloheximid ist das Wachstum von Kolonien auf YEP-Glucose-Platten noch gar nicht vermindert und bei 1000ppm Cycloheximid erst auf 69%. Andererseits kann dieser Effekt aber auch bedeuten, daß die beobachtete Inaktivierung bei K. lactis nur auf die starke Repression dieser Enzyme durch Glucose zurückgeht. Dann ist die Abnahme der spezifischen Aktivität nur auf einen Verdünnungseffekt mit neu synthetisierten Proteinen zurückzuführen. Dafür ist die beobachtete Inaktivierung aber zu schnell.

Wenn die schnelle Inaktivierung der FBPase bei dem LD-Stamm (C. parapsilosis) fehlt, sollte die FBPase-Inaktivierung vollständig irreversibel sein (Lenz und Holzer, 1980; Dröll, 1981). Bei S. cerevisiae ist die schnelle Phase der FBPase-Inaktivierung reversibel und erst die zweite, langsamere Phase irreversibel.

LD wurde in 300ml YEP-Glucose angezogen, 5h dereprimiert und dann durch Zugabe von 30ml 20% D-Glucose inaktiviert. Nach 5, 30, 60, 90 und 120min wurden 50ml Zellsuspension entnommen, mit kaltem KPP solange gewaschen bis keine Glucose im Überstand mehr nachweisbar war, und in 50ml synthetischem Acetat-Medium aufgenommen. In einer Versuchsreihe wurden 1000ppm Cycloheximid als Proteinsynthese-Inhibitor zugesetzt. Alle 30min wurden Proben à 5ml entnommen, zweimal gewaschen und tiefgefroren.

Der Aktivitätsverlauf des Stammes LD ist in Abb. 12 dargestellt. Zum Vergleich ist auch die Reversibilitätsuntersuchung der FBPase-Inaktivierung von S. cerevisiae abgebildet. Man erkennt, daß die Inaktivierung sowohl der MDH als auch der FBPase bei LD im Gegensatz zu catl.S3-14A immer irreversibel ist. C. parapsilosis zeigt also offensichtlich nur den proteolytischen Teil der FBPase Inaktivierung.

Der proteolytische Teil der Inaktivierung läuft wahrscheinlich bei allen drei Enzymen, der FBPase, der MDH und der PEP-CK, nach dem selben Mechanismus ab. Das heißt, daß der Mechanismus der Katabolit-Inaktivierung einfacher sein könnte und es so vielleicht eher gelingt, Mutanten mit ausgefallener Katabolit-Inaktivierung zu isolieren.

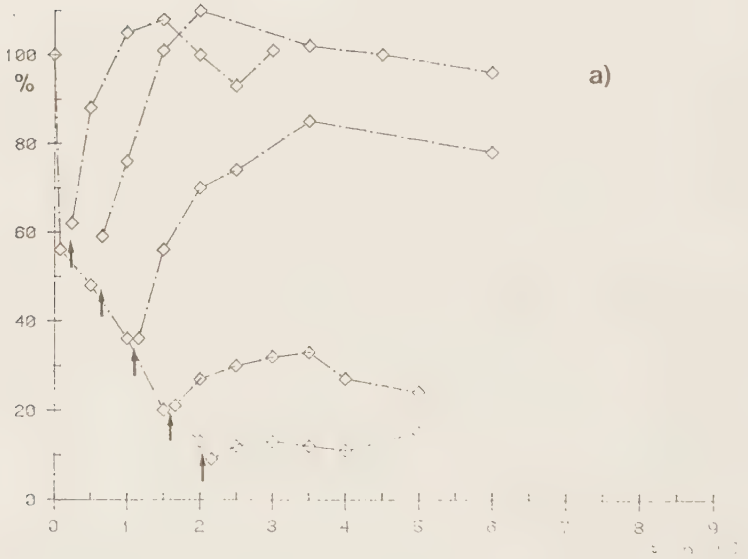
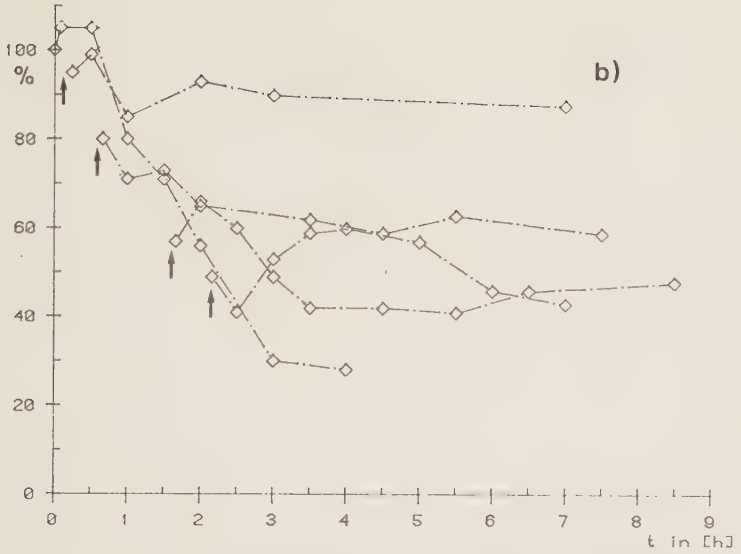
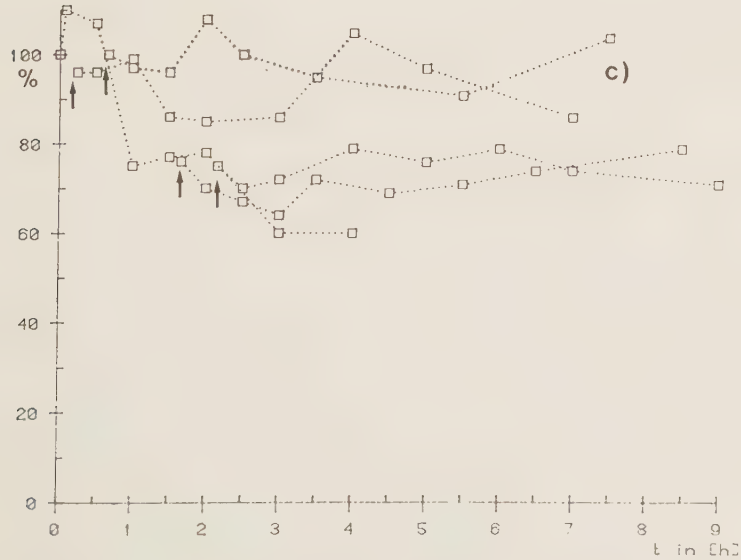


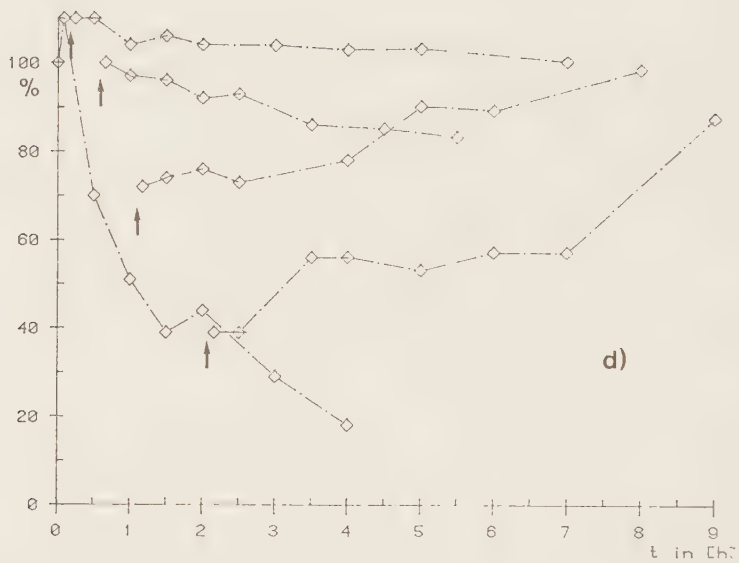
Abb.12 Inaktivierung mit Glucose und Reaktivierung in Acetat-Medium
a) FBPase-Aktivität von catl.S3-14A unter Zusatz von 1000ppm Cycloheximid : 100% ≙ 48mU/mg



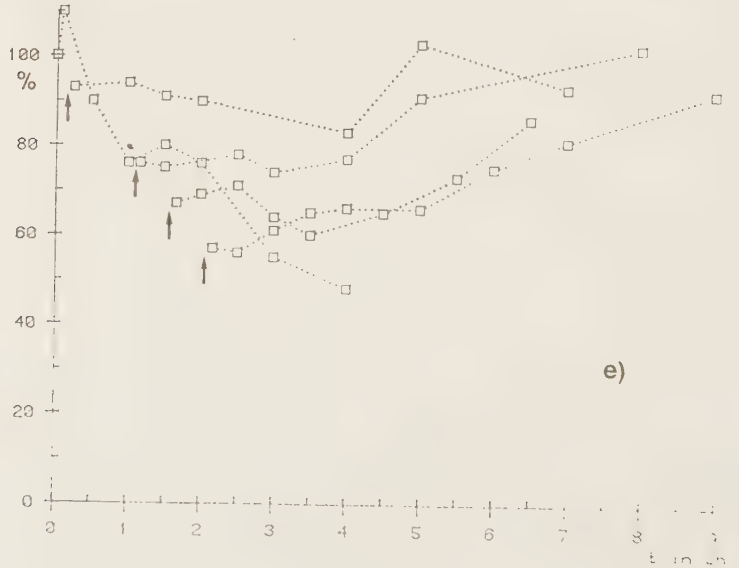
b) FBPase-Aktivität von LD unter Zusatz von 1000ppm Cycloheximid : 100% ≙ 31mU/mg



c) MDH-Aktivität von LD unter Zusatz von 1000ppm Cycloheximid : 100% ≙ 2010mU/mg



d) FBPase-Aktivität von LD ohne Zusatz von Cycloheximid : 100% ≙ 44mU/mg



e) MDH-Aktivität von LD ohne Zusatz von Cycloheximid : 100% ≙ 2866mU/mg

3.5. Identifizierung der Hefe LD und vergleichende Hybridisierung von verschiedenen Hefen

3.5.1. Biochemische Untersuchungen der Hefe LD

Nach Lodder (1970) und Barnett und Pankhurst (1974) wurde der Stamm LD auf verschiedenen Zuckern als C-Quelle angezogen. Dabei konnte er folgende C-Quellen verwerten: Glucose, Fructose, Galactose, Xylose, Saccharose, Maltose, Trehalose, Arbutin, Glycerin und Ethanol. Mit Ribose zeigte sich ein schwaches Wachstum. Nicht wachsen konnte er auf: Lactose, Raffinose, Cellulose, Stärke und Erythrose.

Im Mikroskop wurden bei älteren Zellen teilweise sehr langgestreckte Zellen mit Pseudomycel gesehen, während sonst runde bis ovale Zellen von einem Durchmesser zwischen (2,5-4)x(2,5-5)µm vorlagen.

Zur endgültigen Identifizierung wurde der Stamm ins "Centraalbureau voor Schimmelcultures" in Delft gesandt. Dort wurde der Stamm LD als Candida parapsilosis bestimmt, was mit den bisherigen Ergebnissen übereinstimmt.

3.5.2. Vergleichende Hybridisierung von Gesamt-DNA aus verschiedenen Hefen mit einem Gen aus S. cerevisiae

Um die Identität zweier Hefen oder ihren Verwandschaftsgrad zu zeigen, kann man Gesamt-DNA gegen ein bestimmtes Gen aus einer Hefe hybridisieren. Die DNA wird durch Restriktionsenzyme in Fragmente definierter Größe zerlegt. Ein Gen hybridisiert nun mit den Fragmenten, die Teile seiner Sequenz enthalten. Bei gleicher Größe und Anzahl von Fragment-Banden handelt es sich um dieselbe Spezies, wobei die Anzahl der Banden, die hybridisieren, ein Zeichen der Verwandtschaft darstellt (siehe auch Mason et al., 1984).

Bei diesen Versuchen wurde das Hexokinase PII - Gen aus S. cerevisiae verwendet. Es wurde integriert einerseits auf dem Plasmid YRp7 und andererseits auf dem Phagen M13 von Dr. Kai-Uwe Fröhlich freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zunächst wurde die DNA der Stämme catl.S3-14A (S. cerevisiae), NCYC 737 (C. utilis) und CBS 683 (K. lactis), CBS604, LD (beide C. parapsilosis) und der Mutanten LDcci1 und LDcci2 schonend isoliert (2.11.1.).

Anschließend wurde die DNA-Menge durch Messung der Extinktion bei 260/280nm bestimmt.

	Extinktion bei			DNA-Konzentration
	260nm	280nm	260/280	mg/ml
catl.S3-14A	1.79	0.872	2.06	12.9
CBS 683	0.130	0.070	1.85	0.33
NCYC 737	0.475	0.256	1.85	0.855
CBS 604	0.464	0.237	1.95	6.7
LD	0.855	0.425	2.01	3.1
LDcci1	0.720	0.358	1.91	5.2
LDcci2	0.85	0.431	1.97	6.1

Von der so erhaltenen DNA wurden ca. 0,01-0,02 mg für die jeweiligen Restriktionsschnitte mit EcoR1, HindIII und HindIII + PstI eingesetzt. Nach der Elektrophorese wurde das Gel in einer Ethidiumbromidlösung angefärbt, photographiert, gewaschen und die DNA denaturiert (2.11.2). Die Überführung der DNA auf den Nitrocellulose-Filter (Southern-Blot) dauerte 16h, anschließend wurde der Nitrocellulose-Filter bei 65°C getrocknet und konnte so gelagert werden.

Mit der Methode der Nick-Translation (2.11.3.) wurde das Hexokinase PII-Plasmid radioaktiv markiert. Nach 15min Prähybridisierung wurde 16h bei 65°C gegen den Nitrocellulose-Filter mit

der denaturierten DNA hybridisiert. Anschließend wurde der Nitrocellulose-Filter gewaschen, getrocknet und gegen einen Röntgenfilm exponiert.

In Tabelle 5 sind die DNA-Stücke, die mit dem Plasmid hybridisiert haben, nach der Größe geordnet. Das Plasmid enthält ein TRP1-Gen und das Hexokinase PII-Gen aus S. cerevisiae. Das Hexokinase PII-Gen hybridisiert auch mit den codierenden Sequenzen für die Hexokinase PI, so daß bei catl.S3-14A (S. cerevisiae) bei einem EcoRl-Schnitt 4 Banden erwartet werden: 0,3kBp und 1,75kBp von dem PI-Gen, 4,0kBp von dem PII-Gen und 1,45kBp von dem TRP1-Gen. Diese Banden dienten als innerer Standard zur Abschätzung der anderen DNA-Fragmentgrößen. Mit EcoRl zeigten K.

Mit HindIII werden bei catl.S3-14A für das PII-Gen 2,5 und 2,9kBp und für das PI-Gen zwei größere Fragmente erwartet. HindIII zeigte mit K. lactis 2, mit C. utilis 2, mit C. parapsilosis 1 Bande und mit Crypto. albidus keine Bande. Durch den Doppelschnitt mit HindIII + PstI wird bei catl.S3-14A das PII-Gen in Fragmente mit 0,95, 1,45 und 2,9KBp geschnitten. Dabei zeigte K. lactis 3, C. utilis 1 und C. parapsilosis 3 Banden.

Tab.5 : Hybridisierung von Gesamt-DNA mit einen Hexokinase PII-Plasmid, Fragmente in kBp

	EcoRl - Verdau	HindIII - Verdau	HindIII+PSTl - Verdau
K. lactis	1,7; 4,4	0.8-1; 4,1	0,8; 2,8; 5,6-6
C. utilis	1,4; 5-6	4,5-6	0,7-0,7; 5-6
C. parapsilosis	3,2; 4; 4,7; 5,1	2,8-3,2	1,4; 1,7; 3,2
Crypto. albidus	-	-	-

Eine weitere Hybridisierung wurde mit den Mutanten LDcci1, LDcci2, den Wildtypen LD und CBS604, sowie dem Stamm cat1.S3-14 (S. cerevisiae) durchgeführt. Hybridisiert wurde 19h bei 65°C gegen zwei DNA-Fragmente im M13-Phagen. PH6 hat 837 Bp in Position 1244-407 des PII-Gens von Hexokinase und KB3 hat 534 Bp, wovon 281 BP im eigentlichen Gen und 253 Bp im Promotor liegen (Fröhlich, 1984). Aus dem Phagen wurde die einsträngige "Template-DNA" isoliert und nach 2.11.3. radioaktiv markiert.

Aus Abb. 13 erkennt man, daß alle C. parapsilosis-Kulturen immer die gleiche Anzahl und gleiche Größe von hybridisierten Banden haben, wie es für Hefen derselben Species erwartet wird. S. cerevisiae zeigt dagegen deutlich andere Banden. Das PH6-Stück scheint dabei etwas besser als das KB3-Stück zu hybridisieren, aber insgesamt binden sie an die selben DNA-Fragmente.

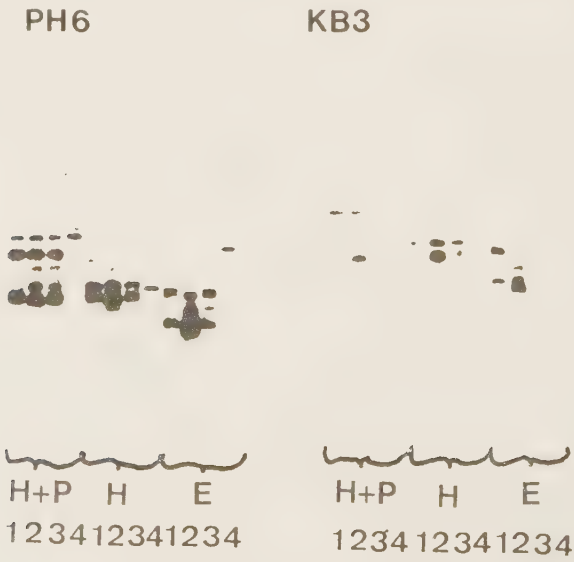


Abb.13 Autoradiographie nach DNA - Hybridisierung gegen zwei Hexokinase PII-Genfragmente bei Restriktionsschnitten der DNA mit EcoR1, Hind, und Hind+PST1 von
1: LD, 2: LDcci1, 3: LDcci2, 4: cat1.S3-14A

3.6. Screening zur Isolierung von Mutanten mit ausgefallener Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung von Candida parapsilosis

Da bei C. parapsilosis offensichtlich die schnelle Phase der FBPase-Inaktivierung nicht gefunden werden kann, sollte der Mechanismus der Inaktivierung einfacher sein. Außerdem scheint die langsame Inaktivierung nicht so zwingend für die Zellen, daß sie ohne Katabolit-Inaktivierung nicht überleben können. Andererseits sollte die relativ nahe Verwandtschaft zu S. cerevisiae für spätere Versuche vorteilhaft sein.

Aufgrund dieser Überlegungen wurden 8000 Kolonien des Stammes LD mit dem Screeningsystem untersucht.

Um die natürliche Mutationsrate zu erhöhen, wurden Zellen von LD mit EMS mutagenisiert. Nach einer Mutationskinetik von LD kann durch Behandeln mit 2% EMS nach 3h10min eine Überlebensrate von ca. 5% erreicht werden. LD wurde in 5ml YEP-Ethanol angezogen. Die Zellsuspension wurde steril abzentrifugiert, in 5ml KPP aufgenommen und mit 2% EMS 3h 10min bei 30°C mutagenisiert. Dann wurden die Zellen 2x gewaschen und zur Ausprägung der Mutation in 10ml frischem YEP-Ethanol aufgenommen. Nach 50h bei 30°C war die Zelldichte erwartungsgemäß nicht angestiegen. Die Zellzahl wurde bestimmt und 1600 Zellen pro Platte YEP-Glycerin/Ethanol ausgestrichen. Nach 4-6 Tagen wuchsen 50-60 Kolonien pro Platte. Die Kontrolle der Mutationsrate ergab 259 Kolonien beim 0-Wert und 3,4 Kolonien nach 3h 10min, dies entspricht einer Überlebensrate von 1.2%.

Mit diesen Zellen wurden die Mutantenscreening-Versuche 75-94 durchgeführt, das entspricht 6300 untersuchten Kolonien. Die Zellkulturen Nr. LD1-LD377 wurden aussortiert.

LD1-LD377 wurden in YEP-Ethanol angezogen und eine "Masterplate" angefertigt. Die Zellsuspension wurde halbiert, bei der einen Hälfte wurde die Inaktivierung durch Zugabe von 0,250ml 5% D-Glucose gestartet, bei der anderen Hälfte wurden die Zellen bei 5000 Ump abzentrifugiert, zweimal mit KPP gewaschen und bei -20°C eingefroren. Nach 1h wurden die inaktivierten Zellen ebenso behandelt.

Die eingefrorenen Zellproben wurden mit Glasperlen aufgeschlossen und die spezifische Aktivität der FBPase bestimmt. Dabei zeigten die Kolonien LD18 und LD235 keine Inaktivierung.

Die Mutanten wurden LDcci1 und LDcci2 genannt. LDcci1 und LDcci2 wurden in 100ml YEP-Glucose angezogen, 5h dereprimiert und mit 10ml 20% D-Glucose (Endkonzentration 0,1M Glucose) inaktiviert. Das Inaktivierungsverhalten zeigt Abb.14. Die FBPase-, MDH- und PEP-CK-Aktivität nehmen nur sehr schwach ab. Erst nach 1-2h nimmt die spezifische Aktivität deutlich ab, was auf das schnelle Wachstum dieses Stammes mit Glucose und die dabei einsetzende Proteinsynthese bei gleichzeitiger Glucose-Repression zurückzuführen sein dürfte.

Um die Proteinsynthese zu unterdrücken wurde eine Inaktivierung unter Zusatz von 1000ppm Cycloheximid durchgeführt. Aus Tab.4 (Seite 52) erkennt man, daß die Mutanten LDcci1 und LDcci2 keine oder eine sehr stark abgeschwächte Kohlenstoff - Katabolit-Inaktivierung zeigen.

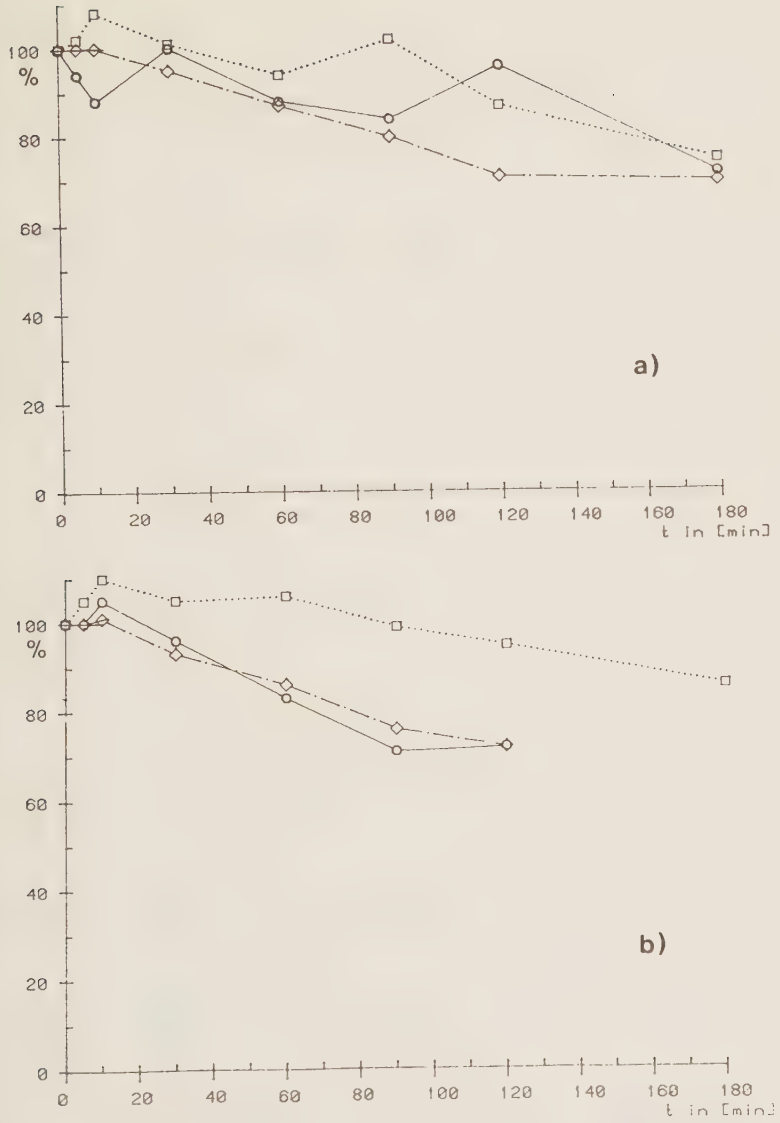


Abb. 14: Inaktivierung der MDH (gepunktet), FBPase (durchbrochen), und PEP-CK (durchgezogen) durch Zugabe von Glucose

a) LDccil: MDH 100% ≙ 1400-2400mU/mg, FBPase 100% ≙ 26-36mU/mg, PEP-CK 100% ≙ 90-130mU/mg

b) LDcci2: MDH 100% ≙ 1500-2800mU/mg, FBPase 100% ≙ 22-37mU/mg, PEP-CK 100% ≙ 70- 90mU/mg

3.7. Biochemische Untersuchungen der Mutanten LDcci1 und LDcci2

3.7.1. Wachstum auf verschiedenen C-Quellen, MDH- und FBPase-Aktivität in unterschiedlichen Wachstumsphasen

Bei Wachstumsuntersuchungen konnten beide Mutanten genau wie der Ausgangsstamm folgende C-Quellen verwerten: Glucose, Fructose, Galactose, Xylose, Saccharose, Maltose, Trehalose, Arbutin, Glycerin und Ethanol. Auch auf YEPD + 100ppm Cycloheximid können die Kulturen LDcci1 und LDcci2 wachsen, erst bei 1000ppm Cycloheximid wachsen keine Kolonien mehr. Kein Wachstum erfolgt mit den C-Quellen Lactose, Raffinose, Cellulose, Stärke und Erythrose. Um zu überprüfen, ob das Glucose-Aufnahmesystem betroffen ist, wurden die Wachstumsgeschwindigkeit und der Glucose-Verbrauch im Medium bestimmt. Erst in der stationären Wachstumsphase wurde die Glucose vollständig aus dem Medium aufgenommen. Als Generationszeit wurde bei YEP-Glucose für LDcci1 und LDcci2 1,5h und bei YEP-Ethanol für LDcci1 2,6-3,3h, für LDcci2 3,0-3,5h gemessen.

Auffällig ist die gegenüber *S. cerevisiae* hohe spezifische Aktivität von FBPase und MDH unter reprimierenden Bedingungen. Je eine Kultur LD, LDcci1 und LDcci2 wurden in 100ml YEP-Glucose angeimpft. Von den logarithmisch wachsenden Kulturen wurde eine Probe zur Enzymbestimmung entnommen; gleichzeitig wurde als Maß des Wachstums die Zelldichte bestimmt. Die Enzymaktivitäten sind in Tab.6 dargestellt. Die spezifische Aktivität der FBPase liegt von Anfang an bei 12mU/mg (*S. cerevisiae*: 3mU/mg), die spezifische Aktivität der MDH bei 700-800 mU/mg (*S. cerevisiae*: 200-400mU/mg). Sind die Zellen stationär auf Glucose, d.h. haben sie alle Glucose verbraucht, so steigen die spezifischen Aktivitäten beider Enzyme an.

Tab.6 : spezifische Aktivität (mU/mg) der MDH und FBPase im Wildtyp LD und den Mutanten LDcci1 und LDcci2 bei Wachstum auf YEP-Glucose

	LD		LDcci1		LDcci2	
Zeit (h)	MDH	FBPase	MDH	FBPase	MDH	FBPase
0	720	12	900	12	810	12
2	720	12	800	12	700	14
3	700	12	770	10	790	12
4,5	600	12				
7	580	11	560	14	770	11
			Glc verbraucht			
9	590	11	810	23	600	13
10	470	10			Glc verbraucht	
	Glc verbraucht					
24	910	17	1030	36	810	18

Tab.7 : spezifische Aktivität (mU/mg)der MDH und FBPase im Wildtyp LD und den Mutanten LDcci1 und LDcci2 bei Wachstum auf YEP-Ethanol

	LD		LDcci1		LDcci2	
Zeit (h)	MDH	FBPase	MDH	FBPase	MDH	FBPase
0	1870	61	2640	57	2610	65
2	2350	62	2620	55	2470	63
3	2300	61	2360	50	2440	63
4	2600	67	2300	51	2440	56
7	2930	64	2200	42	2210	66
8,5	2570	52	2410	45	2380	59
10	2470	60	2130	45	2200	60
13			2580	43	2580	58
24	2500	62	2430	42	2820	63

Tab.8 : Derepression der MDH- und FBPase-Aktivität (mU/mg) von LD in synthetischem Acetatmedium

Zeit (h)	0	1	2	3	4	5	6,5	8	13	27	31
FBPase	10	17	24	26	26	27	28	25	30	33	37
MDH	1014	1324	1361	2599	2447	2748	2735	2769	3493	3585	3565

Entsprechend wurde die spezifische Aktivität in Abhängigkeit des Wachstums auf YEP-Ethanol getestet (Tab.7). Unter diesen dereprimierenden Bedingungen liegen die spezifischen Enzymaktivitäten deutlich höher und zeigen erwartungsgemäß keine Wachstumsabhängigkeit. Zum Vergleich: catl.S3-14A (S. cerevisiae), 55-60mU/mg FBPase, 1800-2300 mU/mg MDH.

Durch Derepression mit synthetischem Acetatmedium werden folgende spezifischen Enzymaktivitäten erreicht: LD, 20-35mU/mg FBPase, 1500-2800mU/mg MDH; LDcci1 21-36mU/mg FBPase, 1400-2100mU/mg MDH; LDcci2 20-37mU/mg FBPase, 1000-2500mU/mg MDH; catl.S3-14A, 20-30mU/mg FBPase, 800-1500mU/mg MDH. Der Verlauf der Derepression bei dem Stamm LD ist in der Tab.8 dargestellt.

Die Mutanten LDcci1 und LDcci2 verhalten sich also in diesen Untersuchungen wie der Ausgangsstamm LD.

3.7.2. Bestimmung der Glykolyse-Enzyme

Die Stämme LD, LDcci1, LDcci2, CBS604, catl.S3-14A und der Cryptococcus albidus wurden in YEP-Glucose und YEP-Ethanol angezogen. Nach Aufschluß mit Glasperlen wurden die spezifischen Enzymaktivitäten bestimmt. Die Werte in Tab. 9 stammen von mindestens zwei unabhängigen Zellproben nach Doppelbestimmungen.

Zwischen dem Ausgangsstamm LD, bzw. dem zweiten Wildtypstamm CBS 604 (beide C. parapsilosis) und den Mutanten LDccil und LDcci2 war bei keinem der gemessenen Enzyme ein Unterschied festzustellen. Im Vergleich zwischen Anzucht auf Glucose und Ethanol war die spezifische Aktivität der Hexokinase, der Phosphofructokinase, der Pyruvatkinase und der Pyruvat Decarboxylase deutlich herabgesetzt. Diese Enzyme katalysieren irreversible Reaktionen, die nur für die Glykolyse benötigt und deshalb bei Ethanol als C-Quelle weniger gebraucht werden. Dasselbe Verhalten zeigte auch der Stamm catl.S3-14A (S. cerevisiae) für die Pyruvatkinase und die Pyruvat Decarboxylase, wobei die spezifische Aktivität auf Glucose allerdings deutlich höher war als bei LD (2-3 fach). Die spezifische Aktivität der Hexokinase war bei catl.S3-14A aber bei Ethanol-Anzucht etwas höher. Die Phosphofructokinase zeigte bei diesem Stamm eine höhere spezifische Aktivität, die aber bei Wachstum auf YEP-Ethanol und YEP-Glucose etwa gleich war (400mU/mg gegen 150-200mU/mg bei LD). Insgesamt lagen die spezifischen Aktivitäten fast aller bestimmten Enzyme bei catl.S3-14A (S. cerevisiae) etwas höher als bei LD und CBS 604 (C. parapsilosis).

Cryptococcus albidus zeigte im Vergleich zu S. cerevisiae und C. parapsilosis geringere spezifische Aktivitäten bei der Hexokinase, der Phosphoglucose Isomerase, der Phosphofructokinase, der Triosephosphat Isomerase, der Glycerinaldehyd 3-phosphat Dehydrogenase, der Phosphoglyceratkinase und der Pyruvat Decarboxylase. Außer der Phosphofructokinase und der Pyruvatkinase sind die Enzymspiegel in YEP-Glucose und YEP-Ethanol ähnlich.

Durch elektrophoretische Auftrennung eines Rohextraktes von LDccil, LDcci2 und catl.S3-14A konnten die Isoenzyme der Hexokinase und eine Glucokinase aufgetrennt werden. Nach 2.10. (Fröhlich, 1982) wurde 1mg Rohextrakt/cm Polyacrylamidgel aufgetragen und 12h bei 70V getrennt. Durch Zerschneiden in 2mm breite

	catl.S3-14A		CBS604		LD		LDccil		LDcci2		Crypto. albidus	
	YEPD	YEPE	YEPD	YEPE	YEPD	YEPE	YEPD	YEPE	YEPD	YEPE	YEPD	YEPE
Glc6P-DH	100-150	160-180	180-250	150-300	200-220	160-180	170-250	150-200	160-300	160-200	140-170	220-280
HK, Glc	550-740	600-770	200-250	90-100	120-200	100-105	180-300	100-150	250-310	90-130	230-300	210-320
HK, Frc	800-1000	650-850	320-400	60-80	190-250	70-75	210-340	80-100	250-410	80-100	210-230	180-250
PGI	1500-2000	700-1000	700-1100	500-550	400-900	400-500	500-800	400-500	500-900	300-500	200-500	300-800
PFK	400-500	270-450	150-220	80-100	110-200	60-70	150-220	50-70	120-180	50-70	50-450	10-100
Aldolase	100-140	100-120	120-130	120-140	100-110	110-120	110-130	100-130	100-130	100-120	60-100	70-90
TPI	6000-8500	4300-6000	2500-4700	2900-4400	2700-3700	2500-3000	2600-4300	2900-3300	3900-4500	2800-3300	400-1000	300-600
GAP-DH	1100-2000	1200-1700	700-1000	700-800	600-800	600-700	500-1000	500-700	800-1100	400-700	400-500	200-250
PGK	2500-3900	1100-3200	1400-2700	1100-1200	1000-1800	1000-1100	1300-2000	900-1300	1100-1800	800-1000	600-700	700-900
PGM	2200-8100	1500-3300	1300-2100	900-1200	1000-1100	900-1100	1300-1500	1000-1300	1300-1400	900-1000	1200-1700	700-1400
Enolase	1500-2200	500-1000	900-1200	800-1200	600-1200	600-700	800-1200	400-600	1100-1200	400-600	300-800	400-500
PYK	700-900	200-400	200-250	100-110	200-230	60-70	150-200	80-85	150-200	70-80	500-600	210-250
PDC	600-750	90-125	300-500	100-110	320-400	60-80	200-280	50-60	250-270	60-70	30-35	20-30

Tabelle 9: Spezifische Aktivität (mU/mg) von: Glc6P-DH - Glucose 6-phophat-Dehydrogenase, HK,Glc - Hexokinase mit Glucose, HK, Frc = Hexokinase mit Fructose, PGI = Phosphoglucose Isomerase, PFK = Phosphofructokinase, TPI - Triosephosphat Isomerase, GAP-DH - Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase, PGK = Phosphoglyceratkinase, PGM - Phosphoglyceratmutase, PYK - Pyruvat Kinase, PDC = Pyruvat Decarboxylase in verschiedenen Hefen nach Wachstum mit Glucose (YEPD) oder Ethanol (YEPE)

Gelstückchen konnte die Enzymaktivität einzeln bestimmt und gegen die Laufstrecke aufgetragen werden. Bei LDccil und LDcci2 lief eine Glucokinase deutlich langsamer als die beiden Hexokinase-Isoenzyme, während bei catl.S3-14A keine Glucokinase detektierbar und die Laufstrecke der Hexokinase-Isoenzyme etwas kürzer war (Abb. 15). Geringe unterschiedliche Laufstrecken werden auch durch verschiedene Versuchsbedingungen bei mehrere Elektrophoresen bedingt.

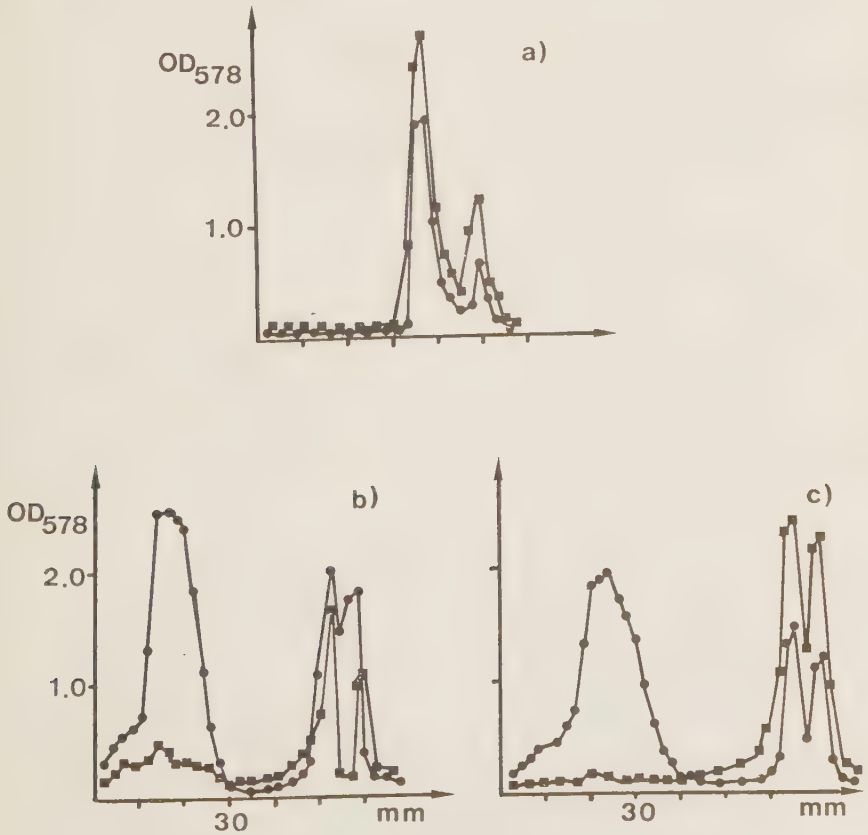


Abb.15 : Anfärbung auf Hexokinase-Aktivität eines Rohextraktes nach Polyacrylamid-Elektrophorese von a) catl.S3-14A, b) LDccil, c) LDcci2 : Hexokinase - Aktivität mit Glucose (Kreise) und Fructose (Quadrate)

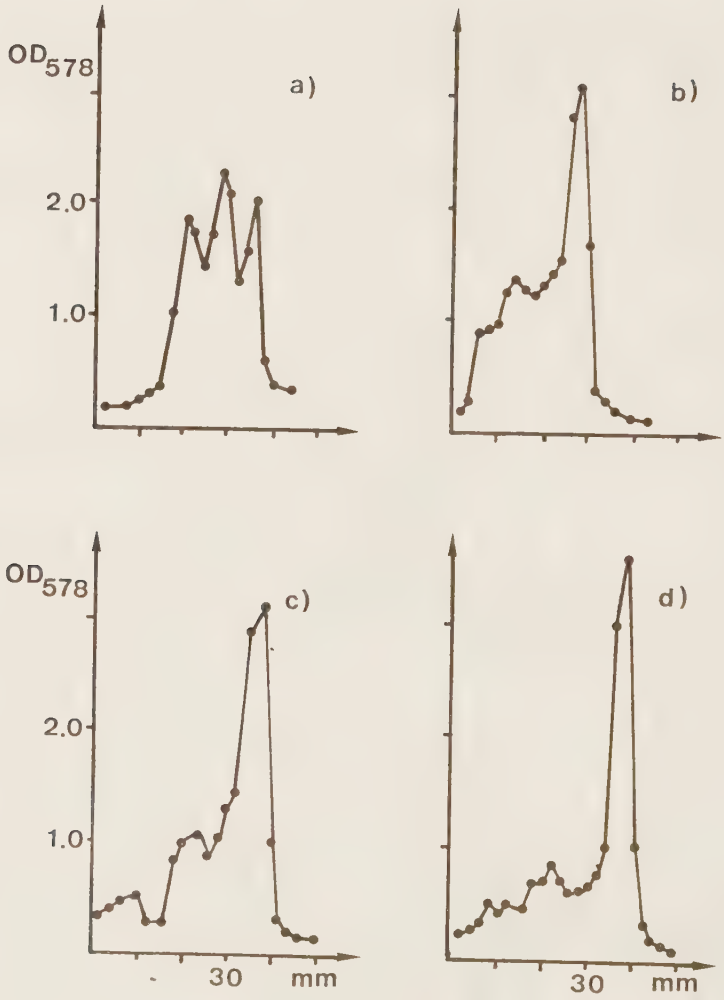


Abb. 16: Anfärbung auf Enolase-Aktivität eines Rohextraktes nach Polyacrylamid-Elektrophorese von
a) catl.S3-14A b) LD c) LDccil d) LDcci2

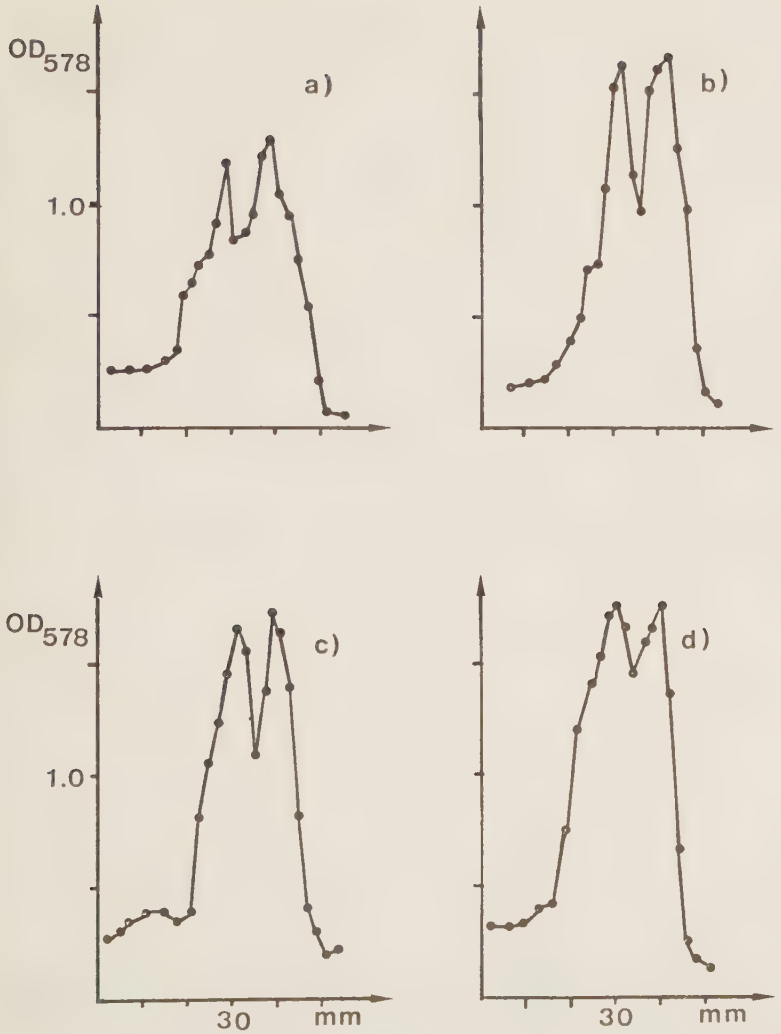


Abb. 17: Anfärbung auf Malat Dehydrogenase-Aktivität eines Rohextraktes nach Polyacrylamid-Elektrophorese von
a) catl.S3-14A b) LD c) LDccil d) LDcci2

Mit derselben Methode der elektrophoretische Auftrennung von Rohextrakten wurden auch die Isoenzyme der Enolase und der MDH untersucht. Bei der Enolase ist die Aktivität des 3.Peaks von C. parapsilosis deutlich höher als der beiden ersten Peaks (Abb.16). Die Peakhöhe der beiden MDH-Isoenzyme ist etwa gleich und entspricht den Ergebnissen von S. cerevisiae (Abb.17).

3.7.3. Bestimmung der Glykolyse-Metabolite

Die Kulturen catl.S3-14A, LD, LDccil, LDcci2 und der Stamm von Cryptococcus albidus wurden in 300ml YEP-Glucose angezogen, 5-6h in synthetischem Acetatmedium dereprimiert und anschließend durch Zugabe von D-Glucose inaktiviert. Kurz vor Zugabe der Glucose und 5, 15, 30 und 60min nach Start der Inaktivierung wurden Proben à 60ml entnommen und wie in 2.7.2. aufgeschlossen. Aus dem Überstand wurden die Metabolite nach 2.8.3. bestimmt. Die Werte sind in Abb.18 dargestellt.

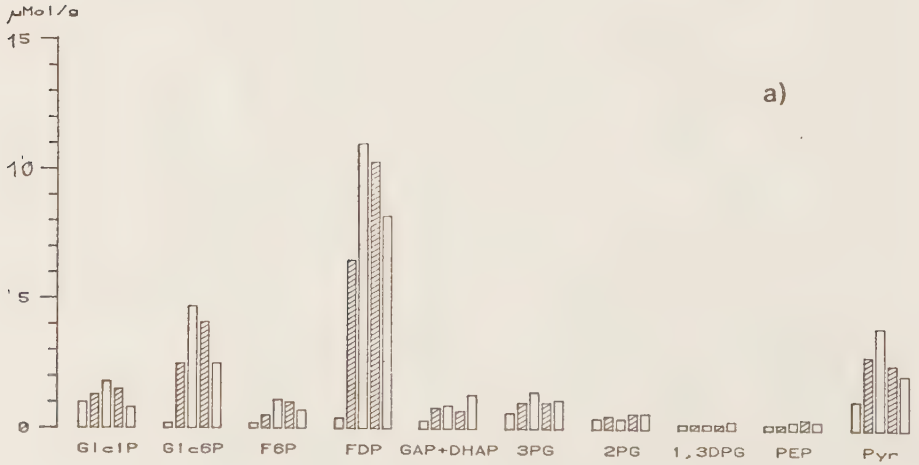


Abb.18: Metabolitbestimmung während der Inaktivierung
a) catl.S3-14A

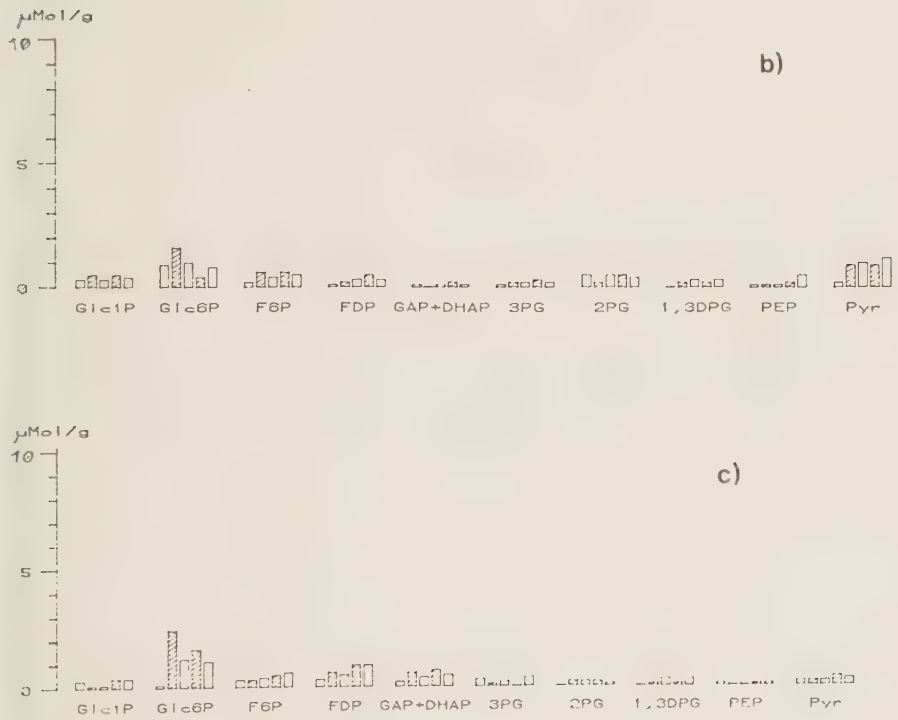


Abb. 18: Metabolitbestimmung während der Inaktivierung; bei jedem Metabolit stellt der erste Wert den Nullwert, die folgenden die Werte nach 5, 15, 30 und 60min nach Start der Inaktivierung dar: GlclP Glucose 1-phosphat, Glc6P Glucose 6-phosphat, F6P Fructose 6-phosphat, FDP Fructose-1,6-bisphosphat, GAP Glycerinaldehydphosphat, DHAP Dihydroxyactetonphosphat, 3PG 3-Phosphoglycerat, 2PG 2-Phosphoglycerat, 1,3DPG 1,3-Diphosphoglycerat, PEP Phosphoenolpyruvat, Pyr Pyruvat
a) catl.S3-14A b) Cryptococcus albidus c) LD

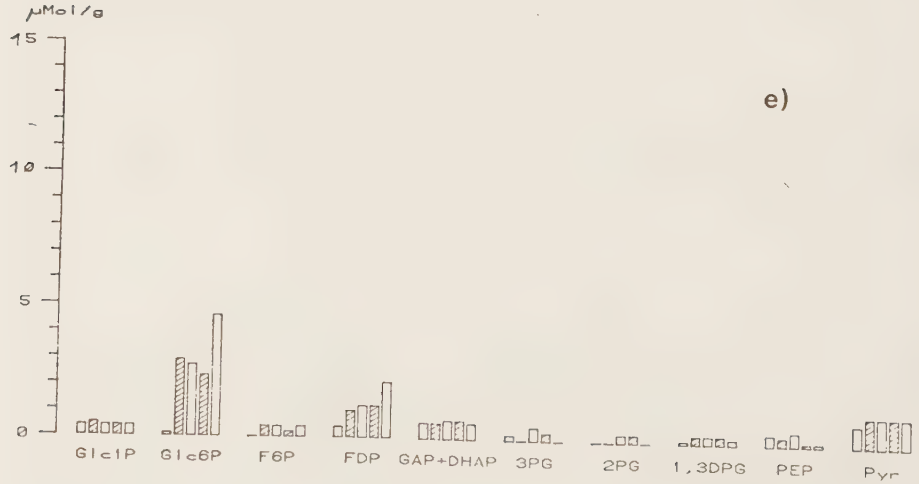


Abb. 18: d) LDcci1 e) LDcci2

Bei allen untersuchten Kulturen stieg die Glucose 6-phosphat-Konzentration erwartungsgemäß nach Glucose-Gabe deutlich an. Der steile Anstieg des Fructose-1,6-bisphosphats von catl.S3-14A (S. cerevisiae) fehlt allerdings bei LD (C. parapsilosis) und Cryptococcus albidus. Der Stamm LD zeigt einen Anstieg auf das dreifache. Andererseits zeigt nur catl.S3-14A nach 5min die schnelle Inaktivierung der FBPase. Außerdem ist die spezifische Aktivität der Phosphofructokinase bei LD unter dereprimierenden Bedingungen (Ethanol-Anzucht) deutlich geringer. Das könnte eine Erklärung für dieses Verhalten sein. Bei Cryptococcus albidus ist unter diesen Gesichtspunkten kein Anstieg des Fructose-1,6-bisphosphats zu erwarten, da diese Hefe keine Glucose-Inaktivierung und -Repression zeigt.

Die anderen Metabolite verhalten sich im Rahmen der Meßgenauigkeit etwa gleich, nur der Anstieg des Pyruvats ist bei S. cerevisiae deutlicher ausgeprägt.

3.7.4. Bestimmung des ATP- und ADP-Gehaltes, sowie des cAMP-Spiegels

ATP und ADP wurden aus denselben Rohextrakten wie die Glykolyse - Metabolite bestimmt. Soweit durch die Aufschlußmethode im Bereich des Energiegehaltes der Zelle keine Verschiebung zu erwarten ist, bleibt die Konzentration von ATP bei 1,5-3µMol/g Trockengewicht und von ADP bei 2-4µMol/g Trockengewicht.

Zur Bestimmung des cAMP-Gehaltes wurden die Zellen mit Essigsäure aufgeschlossen, lyophilisiert und der Rohextrakt durch Zentrifugation gewonnen (2.7.3.). Es wurden Proben kurz vor und 2, 5 und 10min nach der Inaktivierung entnommen. Zellkulturen wurden nach Derepression in synthetischem Acetat-Medium oder nach Anzucht in YEP-Ethanol inaktiviert. 0,1ml Rohextrakt wurden für die cAMP-Bestimmung mit dem Testset von Boehringer, Mannheim eingesetzt und nach Vorschrift behandelt (2.8.3.).

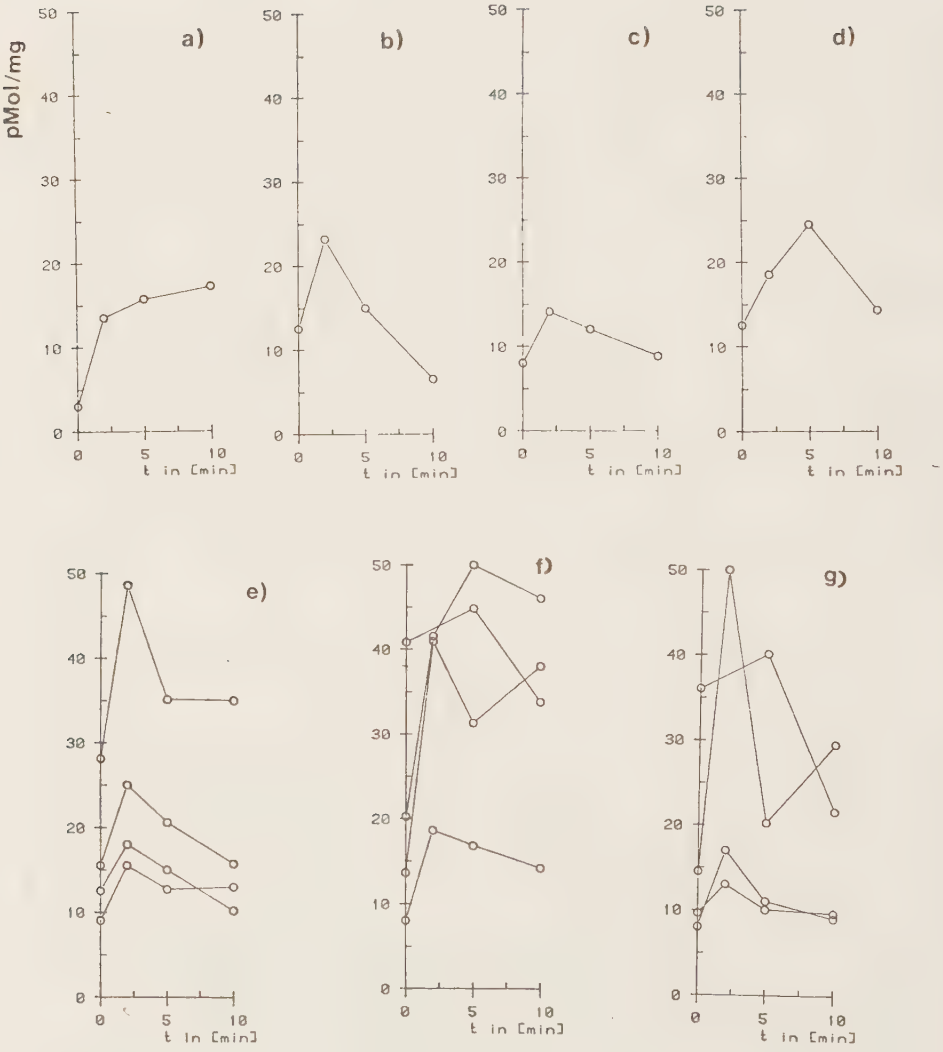


Abb. 19: cAMP-Bestimmung während der Inaktivierung nach Derepression in Acetat-Medium a) - d) nach Anzucht in YEP-Ethanol e) - g) catl.S3-14A a) + e) Crypto. albidus b) LDcci1 c) + f) LDcci2 d) + g)

Abb. 19 zeigt bei allen untersuchten Zellkulturen kurz nach Glucose-Zugabe einen cAMP-Peak. Dieser cAMP-Peak ist für die schnelle FBPase-Inaktivierung bei S. cerevisiae nötig (Tortora et al., 1984), erfolgt aber offensichtlich auch bei C. parapsilosis und Crytococcus albidus, die keine schnelle Inaktivierung zeigen, sowie den Inaktivierungsmutanten.

Bei cat 1.S3-14A findet man nach Derepression in Acetatmedium einen Anstieg nach 2min auf das 3fache, der dann noch geringfügig erhöht wird, während nach Anzucht in YEP-Ethanol der höchste cAMP-Spiegel schon nach 2min erreicht ist. LDccil und LDcci2 zeigen immer den höchsten cAMP-Wert 2min nach Glucose-Gabe. Der Ausgangsspiegel des cAMP kann je nach den Wachstumsbedingungen schwanken und der absolute Anstieg variiert auch, aber ein Peak ist immer zu erkennen.

3.7.5. Fusion von LDccil und LDcci2 mit S. cerevisiae

Um die Mutanten auch genetisch durch Paarung mit anschließender Sporulation weiter untersuchen zu können und um zu sehen, wie sich die Mutation bei S. cerevisiae auswirkt, wurde versucht, die Mutanten LDccil und LDcci2 mit HEX2.0-51B zu fusionieren.

Mit Hilfe von Polyethylenglycol (PEG4000) (Solinger et al., 1977) oder durch elektrische Pulse (Zimmermann, 1982) kann man Sphäroplasten verschmelzen. Dies sollte eventuell auch bei verschiedenen Hefe-Species durchführbar sein (Provost et al., 1978; Whittaker und Lead, 1978, Halfermann et al., 1983).

Die Sphäroplasten wurden, wie in 2.9.3. beschrieben, hergestellt. Dann wurden die Sphäroplasten von LDccil und LDcci2 je mit Sphäroplasten eines Wildtyp-Stammes von S. cerevisiae, der alpha oder a Paarungstyp hatte, 30min bis 2h mit 40% PEG4000 und 10mM Calciumchlorid in 10mM Tris/HCl pH 7,5 inkubiert. Nach der Fusion wurden die Sphäroplasten in 50°C warmen hypertonen Agar gegeben.

Nach 3-5 Tagen wuchsen nur einige Revertanten und es konnte keine überlebende Kolonie einer Fusion zwischen LDccil bzw. LDcci2 und S. cerevisiae gefunden werden.

Die Elektrofusion kann im Mikroskop direkt verfolgt werden und so kann eine spezifischere, auf jeden Fall sichtbare Fusion durchgeführt werden Bei Versuchen zusammen mit der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. C. Emeis und E. Schiffer an der RWTH in Aachen stellte sich jedoch heraus, daß es auch bei dieser Methode sehr schwierig, wenn nicht unmöglich ist, solche Fusionsprodukte sicher zu isolieren. Trotzdem wurde versucht die Sphäroplasten von LDccil bzw. LDcci2 mit einem Wildtyp von S. cerevisiae in der "Mäanderkammer" zu fusionieren. Im Mikroskop konnten bei einer Wechselspannung von 15V und 1000kHz durch einen Doppelpuls von 80V Stärke einige Fusionen beobachtet werden, aber es konnte nicht entschieden werden, ob zwei S. cerevisiae Zellen, zwei LDccil oder eine S. cerevisiae mit einer C. parapsilosis verschmolzen. Von den gewachsenen Kolonien konnten nach Abstempeln auf Kaliumacetat-Agar oder durch Massensporenisolation nach Emeis und Gutz (1958) keine Sporen gefunden werden, und es konnte nicht entschieden werden, ob Fusionsprodukte entstanden waren.

4. Diskussion

Hefen, als einfache, einzellige Eukaryonten, bieten sich zu Untersuchungen der Stoffwechselregulation unter verschiedenen Wachstumsbedingungen an. Dabei zeigt die Hefe Saccharomyces cerevisiae besondere Vorteile. Sie ist leicht zu kultivieren und kommt sowohl in stabiler haploider wie diploider Form vor. Die durch gezielte Paarung zweier haploider Stämme mit unterschiedlichem Paarungstyp (a oder alpha) erhaltenen diploiden Stämme lassen sich durch Sporulation auf Kaliumacetat-Platten und anschließender Tetradensegregation wieder in die haploide Form überführen. Aus dem Segregationsverhalten lassen sich dann Rückschlüsse auf die Lokalisation der Gene ziehen und eventuell vorhandene gegenseitige Wechselwirkungen erhalten.

Außer auf den 17 Chromosomen ist ein Teil der genetischen Information in den Mitochondrien und der sogenannten 2Mikron - DNA gespeichert. Weitere DNA kann als Plasmid durch künstliche Transformation von Protoplasten mit PEG-Behandlung aufgenommen werden. Mit Hilfe dieser Techniken kann die Hefe S. cerevisiae sehr gut genetisch manipuliert und biochemisch untersucht werden.

Als übergeordnete Regulationswege sind bei Hefen die Glucose-Repression, die Stickstoff-Katabolit-Repression, die Phosphat-Repression sowie die Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung bekannt. Die Glucose-Repression betrifft Atmungsenzyme, glucogenetische und Zucker-verwertende Enzyme. Die Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung stellt eine schnelle Antwort auf die Glucose-Zugabe zu dereprimierten Zellen dar und konnte für die Malat Dehydrogenase (MDH) (Witt et al., 1966a), die Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase) (Gancedo, 1971) und die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PEP-CK) (Haarasilta und Oura, 1975; Gancedo und Schwerzmann, 1976)nachgewiesen werden.

Durch Mutanten mit einem Ausfall der Kohlenstoff - Katabolit-Inaktivierung sollte es möglich sein, ähnlich der Glucose-Repression, den Mechanismus dieser Regulation aufzuklären.

Eine Selektion von Inaktivierungs-Mutanten durch Wachstumsvorteile wurde bei Untersuchungen der Wachstumsgeschwindigkeit von inaktivierten und nicht inaktivierten Zellen überprüft. Nachdem dies nicht gelang, wurden Aminosäureanaloga während der Derepression zu inaktivierten Zellen gegeben. Da diese Zellen im Gegensatz zu Inaktivierungs-Mutanten die inaktivierten Enzyme neu synthetisieren müssen, sollten sie stärker von den Aminosäureanaloga geschädigt werden. Das konnte aber nicht nachgewiesen werden und so wurde auf die Anreicherung einer möglichen Mutante verzichtet.

Entsprechend ist es bisher nicht gelungen, die Vorteile der Inaktivierung für die Zelle *in vivo* zu zeigen. So konnte der postulierte futile cycle zwischen glykolytischen und gluconeogenetischen Reaktionen nicht nachgewiesen werden (Banuelos und Fraenkel, 1982).

Deshalb ist es möglicherweise so schwierig, ein Selektionssystem für eine Mutante mit Ausfall der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung zu finden. Dies Problem wird dadurch verstärkt, daß die Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung nur für eine relativ kurze Zeitspanne (1-2h) wirksam ist und von der parallel ablaufenden Glucose-Repression, die an einem anderen Punkt der Enzymregulation angreift, teilweise überdeckt wird. Die Glucose-Repression verhindert die Neusynthese einiger Enzyme. Durch das starke Zellwachstum mit Glucose als C-Quelle führt dies nach 2 Stunden zu einer Abnahme der Enzymmenge, die nach ca. 4-6 Stunden beendet ist. Bei Enzymen, wie der Alkohol Dehydrogenase und der Malat Synthase, die nur reprimiert werden, wird das bereits synthetisierte Enzym langsam, entsprechend der natürlichen Umsatzrate abgebaut. Bei der MDH, der PEP-CK und der FBPase, die als Schlüsselenzyme der Glucogenese aus C2-Vorstufen angesehen werden können (s.Abb 1), wird nun die Enzymmenge außerdem durch spezifischen Abbau während der Katabolit-Inaktivierung verringert.

Daher ist es durchaus denkbar, daß eine fehlende Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung durch die Glucose-Repression teilweise kompensiert wird.

Um auch ohne Selektion eine Inaktivierungs-Mutante isolieren zu können, wurde deshalb ein Screening-System ausgearbeitet, das es gestattet, 30000 Kolonien zu untersuchen. Dabei wurden die Zellen direkt in einem dereprimierenden Medium angezogen und inaktiviert. Das Hauptinteresse galt der 2. Phase der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung. Daher wurde zur Überprüfung des Inaktivierungsverhaltens der Zeitpunkt 1h nach Glucose-Zugabe gewählt. Zellernte und -Aufschluß erfolgte durch Sedimentation und enzymatischen Verdau, so daß viele Kolonien in einem Ansatz ohne großen apparativen Aufwand bearbeitet werden konnten. Verglichen wurde die Volumenaktivität einer Zellkultur vor und 1h nach Glucose-Zugabe. Dadurch wurde auch der Einfluß der Repression weitgehend ausgeschaltet. Der angewandte FBPase-Test über einen Tetrazoliumfarbstoff hatte den Vorteil, daß direkt durch Vergleich der dunkelblauen Kontroll-Probe mit der gelben bis hellblauen, inaktivierten Probe das Inaktivierungsverhalten bestimmt werden konnte.

Bei insgesamt 25000 untersuchten Kolonien von S. cerevisiae (20000 mit einer 50%igen und 5000 mit einer 5%igen Überlebensrate nach der Mutagenese) konnte keine Inaktivierungsmutante gefunden werden. Das könnte an der Art der Untersuchung durch das Screeningsystem liegen. Dagegen spricht aber die Isolierung der Hefe Cryptococcus albidus, die keine Inaktivierung zeigt (s. 3.3.) und somit einer Inaktivierungsmutante entspricht. Eine weitere Erklärung kann in den Eigenschaften der gesuchten Mutante liegen. So kann eine Adenylatcyclase-Mutante, die bei näheren Untersuchungen ergab, daß sie nicht inaktiviert, unter den Bedingungen des Screenings nicht wachsen (Tortora et al., 1983). Die Adenylatcyclase-Mutante benötigt zum Wachstum externes cAMP.

Bei der Untersuchung von Glykolyse-Mutanten konnten Mutanten mit defekter Phosphoglycerat Mutase oder Pyruvatkinase nur die MDH nicht mehr inaktivieren, die FBPase, die bei dem Screeningsystem als Testenzym verwendet wurde, konnte aber inaktiviert werden. (Dröll, 1981).

Andererseits kann man aus diesem Ergebnis auch schließen, daß eine Mutation der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung letal ist. Dagegen spricht, daß einige Hefespecies wie S. pombe, Rhodotorula glutinis und Hansenula anomala keine Katabolit-Inaktivierung zeigen (Duntze et al., 1968) Außerdem sollte eine Mutante mit defekter Repression eine ähnliche Veränderung wie eine Inaktivierungsmutante erleiden. Es ist also eher zu vermuten, daß eine Mutation, die zum Ausfall der Katabolit-Inaktivierung führt, dabei das Gleichgewicht innerhalb der Zelle, z.B. des Proteolyse-Apparats, zerstört. Ebenso ist bei Veränderung des Glucose-Aufnahme-Systems mit einer Reihe weiterer, schwerwiegender Defekte der Zelle zu rechnen. Eine andere Erklärung wäre, daß der Mechanismus der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung so komplex ist, daß der Ausfall der Inaktivierung eine Mehrfachmutation erfordert, bei der die einzelnen Effekte nicht mehr erkennbar sind. Bei der Annahme von zwei parallelen Mechanismen der FBPase-Inaktivierung müßten mindestens zwei Mutationen erfolgen, um einen Ausfall der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung zu bewirken.

Diese Annahme kann mit den zwei Phasen der FBPase-Inaktivierung begründet werden. Die schnelle reversible Inaktivierung der FBPase beruht auf der Phosphorylierung eines Serin - Restes mit Hilfe einer cAMP-abhängigen Proteinkinase. Bislang konnte nicht nachgewiesen werden, ob die Phosphorylierung eine Voraussetzung für die später einsetzende Inaktivierung ist. Bei der MDH und der PEP-CK wurde keine Phosphorylierung gefunden. Der proteolytische Teil der Inaktivierung könnte dagegen bei allen

drei Enzymen nach dem gleichen Mechanismus abzulaufen. Dafür spricht die Auslösung der Inaktivierung aller drei Enzyme sowohl durch Glucose, als auch durch Fructose und Mannose. Die bisher beschriebenen Unterschiede beziehen sich nur auf die schnelle, reversible Phase der FBPase-Inaktivierung. So zeigt eine Adenylatcyklase - Mutante bei Glucose - Gabe keine Katabolit-Inaktivierung. Durch Zugabe von exogenem cAMP, das diese Mutante aufnehmen kann, wird einzig die FBPase, aber nur reversibel inaktiviert. Erst durch cAMP- und Glucose-Zugabe können alle drei Enzyme, jetzt irreversibel, inaktiviert werden (Tortora et al., 1984).

Aus diesen Gründen sollte es interessant sein, eine Hefe-Gattung zu untersuchen, die eine einfachere Inaktivierung zeigt. Ein Vergleich der durch Glucose ausgelösten Katabolit-Inaktivierung zwischen verschiedenen Hefe-Species ergab, daß nur bei S. cerevisiae eine schnelle Inaktivierung der FBPase gefunden wird. Bei den Stämmen LD, CBS604 (beide C. parapsilosis) und bei CBS683 (K. lactis) setzt die Inaktivierung erst nach einer Latenzzeit von 10-20min ein und zeigt dann eine parallele Abnahme von MDH-, FBPase- und PEP-CK-Aktivität. Obwohl C. utilis unter dereprimierenden Bedingungen nur sehr niedrige spezifische Aktivitäten der FBPase hat, kann eine Inaktivierung der MDH und der FBPase nachgewiesen werden. Die Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung ist also offenbar ein unter Hefen weit verbreitetes Regulationsprinzip.

Durch Zugabe von Cycloheximid kann man die Proteinsynthese hemmen und so die durch Glucose-Repression bedingte Aktivitätsabnahme verhindern. Das gibt einen zusätzlichen Hinweis, daß es sich um eine Inaktivierung handelt. 1000ppm Cycloheximid verhindert bei allen untersuchten Hefe-Species eine Inaktivierung der MDH. Dies wurde von Greig et al. (1958) und Entian (1979) auf einen unspezifischen Effekt durch Hemmung der Glykolyse zurückgeführt. Die FBPase und die PEP-CK können aber trotzdem bei S. cerevisiae und C. parapsilosis inaktiviert werden. Bei CBS683 (K. lactis)

erlauben 100ppm Cycloheximid - bei dieser Konzentration wird aber das Wachstum der Zellen durch Hemmung der Proteinsynthese noch nicht geschädigt - noch eine Inaktivierung der FBPase und der PEP-CK, während bei 1000ppm Cycloheximid keine Aktivitätsabnahme nachweisbar ist. Dieser Befund ist entweder auch auf das Cycloheximid selbst zurückzuführen oder bedeutet, daß bei K. lactis die Proteinsynthese auch vor oder während der Katabolit-Inaktivierung eine Rolle spielt. Die Aktivitätsabnahme nach Glucose-Zugabe verläuft aber zu schnell, um allein durch Hemmung der de novo Proteinsynthese (Glucose-Repression) erklärt zu werden. Dies könnte durch weitere Versuche, ähnlich den Versuchen mit trp-auxotrophen und T-sensitiven Mutanten von S. cerevisiae (Duntze et al., 1968; Neeff und Heer, 1978) geklärt werden.

Ein wichtiges Merkmal der schnellen FBPase-Inaktivierung ist ihre Reversibilität. Bis zu 30min nach der Inaktivierung steigt die FBPase-Aktivität bei Wechsel auf dereprimierendes Medium schnell wieder an. Erst bei einem späterem Wechsel wird bei S. cerevisiae auch die FBPase wie die MDH irreversibel inaktiviert. Bei C. parapsilosis fehlt die schnelle Inaktivierung der FBPase, und entsprechend wird die FBPase-Aktivität immer irreversibel inaktiviert. So steigt bei einem Wechsel auf dereprimierendes Medium 30min nach der Inaktivierung ohne Zusatz von Cycloheximid die Aktivität erst nach 3-5h durch erneute Proteinsynthese, d.h. durch Derepression an. Bei Zusatz von Cycloheximid zu dem Derepressionsmedium bleibt die Aktivität konstant. Dies weist auf einen einfacheren Mechanismus der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung bei C. parapsilosis hin.

Daraufhin wurden 8000 Kolonien von LD mutagenisiert und getestet. Dabei konnten zwei Mutanten isoliert werden. Die beiden Mutanten, genannt LDcci1 und LDcci2, verhalten sich sehr ähnlich und können weder die FBPase noch die MDH und PEP-CK inaktivieren. Sie zeigen aber eine deutliche Glucose-Repression, wenn auch die spezifischen Aktivitäten unter reprimierten Bedingungen etwas höher liegen.

Dieses Ergebnis zeigt noch einmal deutlich, daß es das Screening-System als solches ermöglicht, Mutanten mit fehlender Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung zu isolieren. Auch die Erfolgsrate liegt im zu erwartendem Rahmen. Dies ist ein starker Hinweis darauf, daß bei S. cerevisiae keine Mutanten der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung isoliert werden können.

Mögliche Angriffspunkte für eine Inaktivierungsmutation sind:
1. Glucose Transport in die Zelle
2. Veränderung der MDH, FBPase oder PEP-CK
3. Mutation einer spezifischen Protease
4. Veränderung der Aufnahme der inaktivierbaren Enzyme in Vesikel
5. Veränderung der schnelle Inaktivierung, wenn diese eine Voraussetzung der langsamen Inaktivierung ist

Die Mutanten LDcci1 und LDcci2 verbrauchen die Glucose nur langsam, aber sie können die Glucose vollständig aufnehmen, so daß ein Defekt des Glucose-Transportsystems ausgeschlossen werden kann.

Ein cAMP-Peak nach Glucose-Gabe ist bei den Mutanten LDcci1 und LDcci2 nachweisbar. Dieser, für die Auslösung der Inaktivierung nötige Schritt ist also bei den Inaktivierungs-Mutanten LDcci1 und LDcci2 nicht betroffen. Ebenso zeigt auch Cryptococcus albidus einen cAMP-Peak nach Glucose-Gabe, obwohl diese Hefegattung nicht inaktiviert. Daher kann man vermuten, daß der cAMP-Anstieg noch für weitere Regulationen notwendig ist.

Die Bestimmung der Glykolyse-Metabolite während der Inaktivierung zeigte 5min nach Glucose-Zugabe einen deutlichen Anstieg von Glucose 6-phosphat. Dieser Anstieg ist bei allen drei untersuchten Hefe-Species zu finden, und ist ein Zeichen dafür, daß die Glucose schnell aufgenommen und phosphoryliert wird. Auffällig ist der starke Anstieg des Fructose-1,6-bisphosphats von 0,4 auf ca 10µMol/g Trockengewicht bei catl.S3-14A. Diese Zunahme

tritt bei LD nur schwach und bei Cryptococcus albidus gar nicht auf. Ein möglicher Grund für dieses Verhalten liegt in der schnellen FBPase-Inaktivierung von catl.S3-14A. LD hat 5min nach Start der Inaktivierung noch 90-100% der FBPase-Aktivität. Außerdem ist bei LD auch eine deutlich geringere Phosphofructokinase-Aktivität unter dereprimierenden Bedingungen festzustellen. Die Mutanten LDcci1 und LDcci2 zeigen im Vergleich zu LD noch einen etwas schwächeren Anstieg des Fructose-1,6-bisphosphats, verhalten sich aber sonst wie der Wildtyp.

Somit zeigen die Mutanten schon zwei Kriterien, die für die Katabolit-Inaktivierung als notwendig angesehen werden. Der cAMP-Peak ist zwar dringend nötig, reicht aber allein zur Auslösung der Katabolit-Inaktivierung nicht aus (Tortora et al., 1984). Glucose muß zusätzlich aufgenommen werden. Eine Verstoffwechselung der Glucose in der Glykolyse ist andererseits aber nicht zwingend erforderlich (Dröll,1981).

Auch die Bestimmung der spezifischen Aktivität der Glykolyse-Enzyme brachte keine Unterschiede zwischen den Mutanten und dem Wildtyp. Durch elektrophoretische Auftrennung des Rohextraktes bei LDcci1 und LDcci2 konnte im Gegensatz zu catl.S3-14A neben den zwei Hexokinase-Isoenzymen auch die Glucokinase nachgewiesen werden. Diese Glucokinase überwiegt offensichtlich auch bei der Anzucht in YEP-Ethanol, da dort der Quotient aus spezifischer Aktivität mit Glucose zu Fructose stark absinkt. Wie in S. cerevisiae gibt es auch bei C. parapsilosis zwei MDH-Isoenzyme und drei Enolase-Isoenzyme, von denen eins allerdings weit überwiegt.

Die Hybridisierung eines Hexokinase-Gens aus S. cerevisiae mit aus Gesamt-DNA mit Restriktionsendonukleasen hergestellten Fragmenten aus C. parapsilosis, C. utilis und K. lactis zeigte im Gegensatz zu Cryptococcus albidus mehrere Banden. Die Größe der Genstücke ist unterschiedlich, wie es für verschiedene Species zu erwarten ist. Ähnliche Hybridisierungen zwischen verschiedenen

Candida-Unterarten wurden von Mason et al. (1984) zur Bestimmung des Verwandschaftsgrades durchgeführt. Die Tatsache, daß das Hexokinase PII-Gen von S. cerevisiae mit der DNA von C. parapsilosis hybridisiert, deutet auf die Verwandschaft dieser Stämme hin.

C. parapsilosis bildet keine Sporen (van Uden, 1959; Lodder, 1970), und gehört daher zu den anaskosporogenen Hefen. Deshalb können die Mutanten nicht einfach durch Paarung mit anschließender Sporulation weiter genetisch untersucht werden. Auch um die Mutation auf Dominanz oder Rezessivität zu überprüfen, mußte also versucht werden, die Mutanten LDcci1 und LDcci2 mit einem Stamm von S. cerevisiae zu fusionieren. Dabei könnte gleichzeitig untersucht werden, wie sich die Mutation bei S. cerevisiae verhält. Eine Protoplastenfusion mit PEG von S. fibuligera mit C. tropicalis gelang Provost et al. (1978), und auch zwei Unterspecies von K. lactis konnten miteinander (Whittaker und Lead, 1978) verschmolzen werden. Im Gegensatz dazu konnten von S. cerevisiae und den Mutanten LDcci1 und LDcci2 keine eindeutigen Fusionsprodukte erhalten werden. Auch die Elektrofusion brachte keinen Erfolg. Eine Schwierigkeit bestand aber darin, daß die fusionierten Zellen nicht direkt durch Komplementierung einer Wachstumsauxotrophie erkannt werden konnten. Bei diesen Untersuchungen wurde nur durch Abstempeln auf Kaliumacetat-Agar oder durch Massensporen-Isolation nach Sporen gesucht. Sollte es aber gelingen, ein Aminosäurebedürfnis in diesen Mutanten zu erzeugen, so kann durch weitere Versuche mit stärkerem Selektionsdruck vielleicht doch noch eine Fusion erreicht werden.

Bei den bisherigen Untersuchungen ergaben sich nur Unterschiede zwischen S. cerevisiae und C. parapsilosis, aber keine gravierenden unterschiedlichen phänotypischen Merkmale zwischen LD als Wildtyp und LDcci1 bzw. LDcci2 als Mutanten. Interessant wäre zu prüfen, ob eine Phosphorylierung der FBPase bei C. parapsilosis

langsamer erfolgt, eventuell ohne Aktivitätsverlust, oder ob dieser Teil der FBPase-Inaktivierung nur bei S. cerevisiae vorkommt und somit nur für die schnelle FBPase-Inaktivierung erforderlich ist (zwei parallele Mechanismen). C. parapsilosis paßt sich auch ohne schnelle Inaktivierung effektiv genug den wechselnden Nahrungsangeboten an. Auch die Mutanten scheinen, was ihre Wachstumsgeschwindigkeit betrifft, nicht sehr behindert zu sein. Bei ihnen reicht offensichtlich allein die Repression für eine ausreichende Regulation zwischen Glykolyse und Glucogenese aus.

5. Zusammenfassung

Isolierung von Mutanten mit defekter Kohlenstoff - Katabolit-Inaktivierung

Zusatz von D-Glucose zu Hefekulturen, die auf glucosefreien Medien gewachsen waren, bewirkt einen raschen Abfall der spezifischen Aktivität der Enzyme Fructose-1,6-bisphosphatase, Malat Dehydrogenase und Phosphoenolpyruvat Carboxykinase. Mit einem neu ausgearbeiteten Screeningsystem sollten Mutanten von S. cerevisiae, die einen Ausfall der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung zeigen, isoliert werden.

Mit dem Screeningsystem können mit Hilfe von drei eigens konstruierten Apparaturen je 45 Kolonien auf einmal untersucht werden. Zur Bestimmung des Inaktivierungsverhaltens wurde die Fructose 1,6-bisphosphatase-Aktivität durch Nachweis des im Enzymtest entstandenen NADPHś über die Bildung eines blauen Tetrazoliumsalzes gemessen, und mit der nicht inaktivierten, gleich behandelten Probe verglichen. Nicht inaktivierende Hefen ergaben in den parallelen Ansätzen die gleiche Farbintensität und konnten so gut identifiziert werden.

Aus 25000 untersuchten mutagenisierten Kolonien von S. cerevisiae, konnte keine Mutante isoliert werden. S. cerevisiae zeigt zwei Stufen der FBPase-Inaktivierung, eine schnelle reversible und eine langsame irrevesible, die zwei parallelen Mechanismen entsprechen könnten. Das könnte das Entstehen einer Mutation mit Ausfall der gesamten Inaktivierung unwahrscheinlich machen. Nach Untersuchungen der Inaktivierung verschiedener Hefe-Species wurde für weitere Screening-Versuche der Stamm LD der Hefe C. parapsilosis gewählt. Bei dieser Hefe-Gattung kommt nur die irreversible, langsame Inaktivierung der Fructose-1,6-bisphosphatase vor. Der Stamm LD inaktiviert die Fructose-1,6-bisphosphatase,

die Malat Dehydrogenase und die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase immer irreversibel und mit einer Latenzzeit von 10-20min nach Glucose-Zugabe, was einem einfacheren molekularen Mechanismus entsprechen könnte.

Aus 8000 mutagenisierten Kolonien konnten zwei Mutanten, genannt LDcci1 und LDcci2, isoliert werden. Diese Mutanten inaktivieren keines der drei Enzyme, können aber diese und andere Enzyme durch Glucose reprimieren. Die Bestimmung der Glykolyse-Metabolite, des cAMP-Gehaltes und des Energiespiegels während der Inaktivierung zeigten keine gravierenden Unterschiede zu dem Ausgangsstamm. Der steile Fructose-1,6-bisphosphat-Anstieg auf das 10-20fache bei S. cerevisiae nach Glucose-Gabe ist bei C. parapsilosis und den Mutanten auf das 2-3fache reduziert. Die spezifische Aktivität der Glykolyse-Enzyme der Mutanten entsprechen denen des Wildtyp-Stammes LD und liegen etwas niedriger als bei catl.S3-14A. Versuche, die Mutanten mit einem Wildtyp-Stamm von S. cerevisiae mit Hilfe von Polyethylenglycol oder durch Elektrofusion zu verschmelzen, führten zu keinen identifizierbaren Produkten.

Durch Hybridisierung der Gesamt-DNA mit dem Hexokinase PII-Gen aus S. cerevisiae wurden verschiedene Hefe-Species verglichen.

6. Literaturverzeichnis

Achstetter, T.; Ehmann, C.; Wolf, D.H.: New proteolytic enzymes in yeast. Arch. Biochem. Biophys. 207, 445-454 (1981).

Achstetter, T.; Ehmann, C.; Wolf, D.H.: Aminopeptidase C, a new yeast peptidase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 109, 341-347 (1982a).

Achstetter, T.; Ehmann, C.; Wolf, D.H.: Proteolysis in eucaryotic cells: aminopeptidases and dipeptidyl aminopeptidases of yeast revisited. Arch. Biochem. Biophys. 226, 292-305 (1982b).

Achstetter, T.; Emter, O.; Ehmann, C. and Wolf, D.H.: Proteolysis in eukaryotic cells: Identification of multiple proteolytic enzymes in yeast. J. Biol. Chem., 259, 13334-13343 (1984a).

Achstetter, T.; Ehmann, C.; Osaki, A. and Wolf, D.H.: Proteolysis in eukaryotic cells: Proteinase yscE, a new yeast peptidase. J. Biol. Chem., 259, 13344-13348 (1984b).

Banuelos, M.; Fraenkel, D.G.: Saccharomyces carlsbergensis fdp mutant and futile cycling of fructose-6-phosphate. Mol. Cel. Biol. 2, 921-929 (1982).

Barnett, J.A., and Pankhurst, R.J.: A new key to yeasts. a key for identifying yeasts based on physiolgical tests only. North-Holland Publ., Amsterdam (1974).

Bergmeyer, H.U.: Methoden der enzymatischen Analyse. Verlag Chemie, Weinheim, (1970).

Brown, H.D.; Satyanarayama, T.; Umbarger, H.E.: Biosynthesis of branched-chain amino acids in biosynthetic enzymes. J. Bact. 121, 959-969 (1975).

Ciriacy, M.: Genetics of alcohol dehydrogenase in Saccharomyces cerevisiae. I. Isolation and genetic analysis of mutants. Mut. Res. 29, 315-326 (1975).

Ciriacy, M.: Isolation and characterization of yeast mutants defective in intermediary carbon metabolism and in carbon catabolite repression. Mol. Gen. Genet. 154, 213-220 (1977).

Ciriacy, M.: A yeast mutant with glucose-resistant formation of mitochondrial enzymes. Mol. Gen. Genet. 129, 329-335 (1978).

Dröll, L.: Katabolit - Inaktivierung von Fructose-1,6-bisphosphatase und Malatdehydrogenase in Glykolyse-Mutanten von Saccharomyces cerevisiae. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1981).

Duntze, W.; Neumann, D.; Holzer, H.: Glucose induced inactivation of malate-dehydrogenase in intact yeast cells. Eur. J. Biochem. 3, 326-331 (1968).

Duntze, W.; Neumann, D.; Gancedo, J.M.; Atzpodien, W.; Holzer, H.: Studies on the regulation and localisation of the glyoxylate cycle enzymes in Saccharomyces cerevisiae. Eur. J. Biochem. 10, 83-89 (1969).

Emeis, C. und Gutz, H.: Eine einfache Technik zur Massenisolation von Hefesporen. Z. Naturforschg. 13b, 647-650 (1958).

Entian, K.-D.: Genetic and biochemical evidence for hexokinase PII as a key enzyme involved in carbon catabolite repression in yeast. Mol. Gen. Genet. 178, 633-637 (1980a).

Entian, K.-D.: A defect in carbon catabolit repression associated with uncontrollable and excessive maltose uptake. Mol. Gen. Genet. 179, 169-175 (1980b).

Entian, K.-D.: A carbon catabolite repression mutant of Saccharomyces cerevisiae with elevated hexokinase activity: Evidence for a regulatory control of hexokinase PII synthesis. Mol. Gen. Genet. 186, 278-282 (1981).

Entian, K.-D.; Dröll, L.; Mecke, D.: Studies on rapid reversible and non-reversible inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase and malate dehydrogenase in wild-type and glycolytic block mutants of Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 134, 187-192 (1983).

Entian, K.-D.; Fröhlich, K.-U.: Saccharomyces cerevisiae mutants provide evidence of hexokinase PII as a bifunctional enzyme with catalytic and regulatory domains for triggering carbon catabolite repression. J. Bact. 158, 29-35 (1984).

Entian, K.-D.; Fröhlich, K.-U.; Mecke, D.: Regulation of enzymes and isoenzymes of carbohydrate metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 799, 181-186 (1984).

Entian, K.-D.; Mecke, D.: Genetic evidence for a role of hexokinase isoenzyme PII in carbon catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 257, 870-874 (1982).

Entian, K.-D.; Zimmermann, F.K.: Glycolytic enzymes and intermediates in carbon catabolite repression mutants of Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 177, 345-350 (1980).

Entian, K.-D.; Zimmermann, F.K.; Scheel, I.: A partial defect in carbon catabolite repression in mutants of Saccharomyces cerevisiae with reduced hexose phosphorylation. Mol. Gen. Genet. 156, 99-105 (1977).

Epps, H.M.R.; Gale, E.F.: The influence of the presence of glucose during growth on the enzymic activities of Escherichia coli: comparison of the effect with that produced by fermentation acids. Biochem. J. 36, 619-623 (1942).

Eraso, P. and Gancedo, M.: Catabolite repression in yeast is not associated with low levels of cAMP. Eur. J. Biochem. 141, 195-198 (1984).

Ferguson, J.J.; Boll, M.; Holzer, H.: Yeast malate dehydrogenase: enzyme inactivation on catabolite repression. Eur. J. Biochem. 1, 21-25 (1967).

Fowell, R.: Sodium acetate agar as a sporulation medium for yeast. Nature 170, 578 (1952).

Frey, J; Röhm, K.-H.: Subcellular localization and levels of aminopeptidases and dipeptidase in Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 527, 31-41 (1978).

Fröhlich, K.-U.: Enzymatische und genetische Regulation der Kohlenstoff-Katabolitrepression und der Glucogenese in der Hefe Saccharomyces cerevisiae. Diplomarbeit, Universität Tübingen (1982).

Fröhlich, K.-U.: Die Funktion der Hexokinase PII bei der Glucose-Repression in der Hefe Saccharomyces cerevisiae Dissertation, Universität Tübingen (1984).

Fröhlich, K.-U.; Entian, K.-D.: Regulation of gluconeogenesis in the yeast Saccharomyces cerevisiae: evidence for a conversion of enolase isoenzymes. FEBS Lett. 139, 164-166 (1982).

Fröhlich, K.-U.; Entian, K.-D.; Mecke, D.: Cloning and restriction analysis of the hexokinase PII gene of the yeast Saccharomyces cerevisiae. Mol. Gen. Genet. 194, 144-148 (1984).

Funayama, S.: Gancedo, J.M.; Gancedo, C.: Turnover of yeast fructose-bisphosphatase in different metabolic conditions. Eur. J. Biochem. 109, 61-66 (1980).

Furuja, E.; Kontaniguchi, H. and Hagihara, B.: The effect of oxygen on fructose-2,6-bisphophate - concentration and fructose-6 phosphat,2-kinase activity in yeast cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 106, 1519-1523 (1982).

Gancedo, C.: Inactivation of fructose-1,6-diphosphatase by glucose in yeast. J. Bact. 107, 401-405 (1971).

Gancedo, J.M.; Gancedo, C.: Fructose-1,6-diphosphatase, phosphofructokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase from fermenting and non fermenting yeast. Arch. Microbiol. 76, 132-138 (1971).

Gancedo, J.M.; Mazón, M.J.; Gancedo, C.: Kinetic differences between two interconvertible forms of fructose-1,6-bisphosphatase from Saccharomyces cerevisiae, Arch. Biochem. Biophys. 218, 478- 482 (1982).

Gancedo, J.M.; Mazón, M.J.; Gancedo, C.: Fructose 2,6-bisphosphate activates the cAMP-dependent phosphorylation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase in vitro, J. Biol. Chem. 258, 5998-5999 (1983).

Gancedo, C.; Salas, M.L., Giner, A.; Sols, A.: Reciprocal effects of carbon sources on the level of an AMP-sensitive fructose-1,6-diphosphatase and phosphofructokinase in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 20, 15-20 (1965).

Gancedo, C.; Schwerzman, N.: Inactivation by glucose of phosphoenolpyruvate carboxykinase from Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 109, 221-225 (1976).

Gascón, S.; Neumann, N.P.; Lampen, J.O.: Comparative study of the properties of the purified internal and external invertases from yeast. J. Biol. Chem. 243, 1573-1577 (1968).

Gilman, A.G.: A protein binding assay for adenosine3:5-cyclic monophosphate. Proceed. National Acad.Sciences 67, 305-312 (1970).

Greig, M.E.; Walk, R.A.; Gibbons, A.: Effect of actidione (cycloheximide) on yeast fermentation. J. Bact. 75, 489-496 (1958).

Grossmann, M.K.: The use of phenylmethylsulfonyl fluoride in the study of catabolite inactivation and repression in intact yeast cells. Arch. Micribiol. 124, 293-295 (1980).

Haarasilta, S.; Oura, E.: On the activity and regulation of anapleurotic and gluconeogenetic enzymes during the growth process of bakers yeast. The biphasic growth. Eur. J. Biochem. 52, 1-7 (1975).

Hägele, E.; Neeff, J.; Mecke, D.: The malate dehydrogenase isoenzymes of Saccharomyces cerevisiae. Purification characterization and studies on their regulation. Eur. J. Biochem. 83, 67-76 (1978).

Halfermann, H.J.; Emeis, C.C.; and Zimmermann, U.: Elektro-fusion and genetic analysis of fusion products of haploid and polyploid Saccharomyces yeast cells. FEMS Microbiol.Letters 20, 13-16(1983).

Hansen, R.J.; Hinze, H.; and Holzer H.: Assay of phosphoenolpyruvate carboxykinase in crude yeast extracts. Analyt. Biochem. 74, 576-584 (1976).

Hansen, J.R.; Switzer,R.L.; Hinze, H.; Holzer H.: Effects of Glucose and nitrogen source on the levels of Proteinases, Pepdidases, Prot.Inhibitors in Yeast. Biochim.Biophys.Acta 496,103-114 (1977).

Holzer,H.:Catabolite inactivation in yeast.TIBS 8, 178-181 (1976).

Holzer, H.; Heinrich, P.C.: Control of proteolysis. Ann. Rev. Biochem. 49, 63-92 (1980).

Jusić, M.; Hinze, H.; Holzer, H.: Inactivation of yeast enzymes by proteinase A and B and carboxypeptidase from yeast. Hoppe-Seylers. Z. Phys. Chem. 357, 735-740 (1976)

Lederer, B.; Vissens, S.; van Schaftingen, E.; Hers, H.G.: Fructose-2,6-bisphosphate in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 1281-1287 (1981).

Lenz, A.-G.; Holzer, H.: Rapid reversible inactivation of fructose-1,6-bisphosphatase in Saccharomyces cerevisiae by glucose. FEBS Lett. 109, 271-274 (1980).

Lobo, Z.; Maitra, P.K.: Restistance to 2-deoxyglucose in yeast: A direct selection of mutants lacking glucose-phosphorylating enzymes. Mol. Gen. Genet. 157, 297-300 (1977).

Lodder, J.: The yeasts, a taxonomic study. North-Holland Publ., Amsterdam (1970).

Londesborough, J.: Cyclic nucleotide-dependent inactivation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase by ATP. FEBS Letters 144, 269-272 (1982).

Magasanik, B.: Catabolite repression. Cold Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 26, 249-256 (1961).

Mahler, H.R.; Lin, C.C.: Exogenous adenosine 3 :5 -monophosphate can release yeast from catabolite repression. Bichem. Biphys. Res. Commun. 83, 1039-1047 (1978).

Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrook, J.: Molecular cloning. A laboratory journal. Cold Spr. Harb. Lab., New York (1982).

Mason, M.M.; Lasker, B.A.; Riggsby, W.S.: Specific DNA homologies between candida-albicans and candida-stellatoidea. Abstr. Annu. Meet. Am. Soc. Microbiol., 84 Abstact F15 (1984).

Matsumoto, K.U.J.; Soshima, Y.; Ishikawa, T.: Isolation and characterisation of yeast mutants deficient in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase. Proc. Nat. Acad. Sci. 79, 2355-2359 (1982a).

Matsumoto, K.; Uno, J.; Toh-é, A.; Ishikawa, T.; Oshima, Y.: Cyclic AMP may not be involved in catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae: Evidence from mutants capable of utilizing it as an adenine source. J. Bact. 150, 277-285 (1982b)

Mazón, M.J.; Gancedo, J.M.; Gancedo, C.: Inactiation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. In vivo phosphorylation of the enzyme. J. Biol. Chem. 257, 1128-1130 (1982a).

Mazón, M.J.; Gancedo, J.M.; Gancedo, C.: Phosphorylation and inactivation of yeast fructose-bisphosphatase in vivo by glucose and by proton ionophores. A possible role for cAMP. Eur. J. Biochem. 127, 605-608 (1982b).

Mecke, D.; Neeff, J.: Proteolytic catabolite inactivation of yeast cytoplasmic malate dehydrogenase. In: Limited proteolysis in microorganisms. (N. Cohen und H. Holzer, eds.) pp 77-80 US Department of Health (1978).

Molano, J. ; Gancedo, C.: Specific inactivation of fructose-1,6--bisphosphatase from Saccharomyces cerevisiae by a yeast protease. Eur. J. Biochem. 44, 213-217 (1974).

Müller, D.; Holzer, H.: Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast by phosphorylation/dephosphorylation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 103, 926-933 (1981).

Müller, M.; Müller, H.; Holzer, H.: Immunochemical studies on catabolite inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 256, 723-727 (1981).

Müller, M.; Müller, H.; Holzer, H.: Immunochemical studies on catabolite inactivation of phosphoenolpyruvate carboxykinase in Saccharomyces cerevisiae. J. Biol. Chem. 256, 723-727 (1981).

Nazar, R.N.; Lawford, H.G.; and Tze-Fei Wong, J.:An improved procedure for extraction and anaysis of cellular nucleotides. Analyt. Biochem. 25, 305-313 (1970).

Neeff, J.; Hägele, E.; Nauhaus, J.; Heer, U.; Mecke, D.: Application of an immunoassay to the study of yeast malate dehydrogenase inactivation. Biochem. Biophys. Res. Commun. 80, 276-282 (1978).

Neeff, J.; Hasilik, A.; Mecke, D.: The difference in sensitivity of malate dehydrogenase isoenzymes to proteolytic degradation. Abstr. 9 FEBS-Meeting, Budapest p 90. Hungarian Biochem. Soc. (1974).

Neeff, J.; Heer, U.: Catabolite inactivation of yeast cytoplasmic malate dehydrogenase. A process independent of protein synthesis. FEBS Lett. 85, 233-236 (1978).

Neeff, J.; Mecke, D.: In vivo and in vitro studies on the glucose dependent inactivation of yeast cytoplasmic malate dehydrogenase. Arch. Microbiol. 115, 55-60 (1977).

Neidhardt, F.C.; Magasanik, B.: Inhibitory effect of glucose on enzyme formation. Nature 178, 801-802 (1956).

Pohlig, G.; Wingender-Drissen, R.; Noda, T.; and Holzer, H.: Cyclic AMP and fructose-2,6-bisphosphate stimulated in vitro phosphorylation of yeast fructose-1,6-bisphosphatase. Biochem. Biophys. Res. Commun. 115, 317-324 (1983).

Polakis, E.S.; Bartley, W.: Changes in enzyme activities in Saccharomyces cerevisiae during aerobic growth on different carbon sources. Biochem. J. 97, 284-297 (1965).

Polakis, E.S.; Bartley, W.; Meek, G.A.: Changes in the activities of repiratory enzymes during the aerobic growth on yeast on different carbon sources. Biochem. J. 97, 298-302 (1965).

van de Poll, K.W.; Kerkenhaar, A.; Schamhart, D.H.J.: Isolation of a regulatory mutant of fructose-1,6-diphosphatase in Saccharomyces carlsbergensis. J. Bact. 117, 965-970 (1974).

van de Poll, K.W.; Schamhart, D.H.J.: Characterization of a regulatory mutant of fructose-1,6-diphosphatase in Saccharomyces carlsbergensis. Mol. Gen. Genet. 154, 61-66 (1977).

Provost, A.; Bourguignon, C.; Fournier, P.; Ribet, A.M.; and Heslot, H.: Intergeneric hybridization in yeasts through protoplast fusion. FEMS Microbiol. Letters 3, 309-312 (1978).

Purwin, C.; Leidig, F.; Holzer, H.: Cyclic AMP-dependent phosphorylation of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 107, 1482-1489 (1982).

Rigby, P.W.J.; Dieckmann, M.; Rhodes, C.: Berg, P.: Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol. 113, 237-251 (1977).

Schamhart, D.H.J.; van den Heijkant, K.W., van de Poll, K.W.: Inactivation of fructose diphosphatase by sucrose in yeast. J. Bact. 130, 526-528 (1977).

Schlanderer, G.; Dellweg, H.: Cyclic AMP and catabolite repression in yeasts. Eur. J. Biochem. 49, 305-316 (1974).

Schmitt, H.D.; Zimmermann, F.K.: Genetic analysis of the pyruvate decarboxylase reaction in yeast glycolysis. J. Bact. 151, 1146- 1152 (1982).

Sharp, P.A.; Suyden, B.; Sambrook, J.: Detection of two restriction endonuclease activities in Haemophilus parainfluenzae using analytical agarose-ethidium bromide electrophoresis. Biochemistry 12, 3055-3063 (1973).

van Solinger, P. and van der Plaat, J.B.: Fusion of yeast spheroplasts. J. Bact. 130, 946-947 (1977).

Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98, 503-517 (1975).

Spiegelman, S.; Reiner, J.M.: The formation and stabilization of an adaptive enzyme in the absence of its substrate. J. Gen. Physiol. 31, 175-193 (1947).

Suarez Rendueles, M.P., Schwencke, J.; Gracia Alvarez, N.; Gascoń, S.: A new X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from yeast associated with a particulate fraction. FEBS Lett. 131, 296-300 (1981).

Swanson, W.H.; Clifton, C.B.: Growth and assimilation in cultures of Saccharomyces cerevisiae. J. Bact. 56, 115-124 (1948).

Thorne, C.J.R.; Grossmann, L.J.; Kaplan, N.O.: Starch-gel electrophoresis of malate dehydrogenase. Biochem. Biophys. Acta 73, 193-203 (1963).

Tortora, P.; Birtel, M. ; Lenz, A. - G. ; Holzer, H.: Glucose-dependent interconversion of fructose-1,6-bisphosphatase in yeast. Biochem. Biophys. Res. Commun. 100, 688-695 (1981).

Tortora, P.; Burlini, N.; Hanozet, G.M.; Guerritore, A.: Effect of caffeine on glucose-induced inactivation of gluconeogenetic enzymes in Saccharomyces cerevisiae: possible role of cyclic AMP. Eur. J. Biochem. 126, 617-622 (1982).

Tortora, P.; Burlini, N.; Leoni, F.; Guerritore, A.: Dependence on cyclic AMP of glucose-induced inactivation of yeast gluconeogenic enzymes. FEBS Lett. 155, 39-42 (1983).

Tortora, P.; Burlini, N.; Caspani, C.; Guerritore, A.: Studies on glucose-induced inactivation of gluconeogenetic enzymes in adenylate cyclase and cAMP-dependent protein kinase yeast mutants. Eur. J. Biochem. 145, 534-548 (1984).

van Uden, N.; and do Carmo-Sousa, L.: Further studies on the significance of temperature relations and vitamin deficiency patterns in yeast taxonomy. Port. Acta Biologica (B) 6, 239-256 (1959).

Whittaker, P.A. and Leach, S.M.: Interspecific hybrid production between the yeasts Klyveromyces lactis and Klyveromyces fragilis by protoplast fusion. FEMS Microbiol. Letters 4, 31-34 (1978).

van Wijk, R.; Ouwehand, J.; van den Bos, T.; Koningsberger, V.V.: Induction and catabolite repression of alpha-glucosidase synthesis in protoplasts of Saccharomyces carlsbergensis. Biochim. Biophys. Acta 186, 178-191 (1969).

Witt, I.; Kronau, R.; Holzer, H.: Isoenzyme der Malatdehydrogenase und ihre Regulation in Saccharomyces cerevisiae. Biochim. Biophys. Acta 128, 63-73 (1966a).

Witt, I.; Kronau, R.; Holzer, H.: Repression von Alkoholdehydrogenase, Malatdehydrogenase, Isocitratlyase und Malatsynthase in Hefe durch Glucose. Bichim. Biophys. Acta 118, 522-537 (1966b).

Wolf, D.H.: Proteinase action in vitro versus proteinase function in vivo - Mutants shed light on intracellular proteolysis in yeast. TIBS 7, 35-37 (1982).

Wolf, D.H.; Ehmann, C.: Studies on a proteinase B mutant of yeast. Eur. J. Biochem. 98, 375-384 (1979).

Wolfe, R.G.; Neilands, J.B.: Some molecular and kinetic properties of heart malic dehydrogenase. J. Biol. Chem. 221, 61-69 (1956).

Zamenhoff, S. In: Methods in Enzym. (S.P. Colowick und N.O. Kaplan, eds.) 3, p 702 Acad. Press London New York (1957).

Zimmermann, F.K.; Kaufmann, I.; Rasenberger, H.; Haußmann, P.. Genetics of carbon catabolite repression in Saccharomyces cerevisiae: genes involved in the derepression process. Mol. Gen. Genet. 151, 95-103 (1977).

Zimmermann, F.K.; Scheel, I.: Mutants of Saccharomyces cerevisiae resistant to carbon catabolite repression. Mol. Gen. Genet. 154, 75-82 (1977).

Zimmermann, U. and Vienken, J.: Electric field-induced cell-to-cell Fusion. J.Membrane Biol. 67, 165-182 (1982).

Zubenco, G.S.; Jones, E.W.: Catabolite inactivation of gluconeogenic enzymes in mutants of yeast deficient in proteinase B. Genetics 76, 4581-4585 (1979).

Zubenco, G.S.; Mitchell, A.P.; Jones, E.W.: Septum formation, cell division, and sporulation in mutants of yeast deficient in proteinase B. Genetics 76, 2395-2399 (1979).

Meine akademischen Lehrer waren die folgenden Professoren und Dozenten:

Physiologische Chemie	D. Mecke, G. Weitzel, K. Eisele, J. Guglielmi, H. Probst, U. Weber, A. Wendel, U. Weser
Organische Chemie	E. Bayer, M. Hanack, W. Voelter
Anorganische Chemie	J. Strähle, E. Lindner
Physikalische Chemie	W. Zeil, W. Braun, H. Mauser
Mikrobiologie	H. Zähner, V. Braun, W. Seyffert
Pflanzenphysiologie	H. Metzner
Humanphysiologie	E. Betz
Pharmakologie	H. Remmer, H. Machleidt
Zoologie	K. G. Grell
Anatomie	K. Mörike
Physik	F. Gönnenwein, H. Krüger

Lebenslauf

24.5.1956	geboren in Frankfurt am Main als Tochter des Juristen Dr. Klaus Dröll und seiner Frau Jutta Dröll, geb. von Pannwitz
1963-1966	Grundschule in Buchschlag
1966-1975	Lessing-Gymnasium in Frankfurt am Main
15.5.1975	Abitur
WS 1975	Immatrikulation im Studiengang Chemie (Diplom) an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
SS 1976	Wechsel zum Studiengang Biochemie (Diplom)
31.3.1978	Abschluß der Vordiplomsprüfung
Juli 1980	Abschluß der mündlichen Diplomprüfung
Okt. 1980 - Juli 1981	Diplomarbeit mit dem Thema "Katabolit-Inaktivierung von Fructose-1,6-bisphosphatase und Malat Dehydrogenase in Glykolyse-Mutanten von S. cerev."
28.8.1981	Diplom
Juli 1981 - Okt. 1981	Auslandsaufenthalt bei Prof. Dr. R. Switzer an der University of Illinois in Urbana-Champaign, USA
SS 1981 - Ws 1983	Studium der Pharmazie an der Eberhard-Karls-Universität, Tübingen
April 1982	Abschluß des 1. Staatsexamens
April 1984	Abschluß des 2. Staatsexamens
Okt. 198 Mai 1985	Dissertation am physiologisch-chemischen Institut unter Anleitung von Prof. Dr. D. Mecke über das Thema "Untersuchungen zum Mechanismus der Kohlenstoff-Katabolit-Inaktivierung in Hefen: Entwicklung eines Screening-Systems zur Isolierung von Inaktivierungs-Mutanten und deren Charakterisierung"
11. 5. 1985	Heirat mit Marcel Klaus

Druck und Gesamtherstellung:
H. Hummel, Bismarckstr. 116/6
D-7410 Reutlingen, Tel. 0 71 21/4 53 77